

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

***Departamento de Biología***

***Facultad de Ciencias***

**Análisis genético y molecular del gen *bHLH149*  
en la respuesta al ayuno de fosfato**

***TESIS DOCTORAL***

***Isabel Mateos Moreno***

***Madrid, 2010***



Memoria presentada por Dña. Isabel Mateos Moreno, Licenciada en Biología, para  
optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Vº Bº de los Directores de Tesis

**Dr. Francisco Javier Paz-Ares Rodríguez**

**Dr. José Manuel Franco Zorrilla**

Vº Bº de la Tutora de Tesis

**Dra. Francisca Fernández del Campo**

El Doctorando

**Dña. Isabel Mateos Moreno**



## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración y el esfuerzo de muchas personas, a las que debo mi sincero agradecimiento.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Javier Paz-Ares por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo en su grupo, su dirección y sobre todo sus críticas, de las que he aprendido mucho.

Por otra parte quiero expresar mi agradecimiento más sincero al Dr. José Manuel Franco por la codirección de este trabajo, por su gran paciencia y dedicación.

A la Dra. Francisca Fernández del Campo por su amabilidad y colaboración.

Al Dr. Vicente Rubio por su ayuda.

A todos mis compañeros del 311-312 que han hecho que la realización de este trabajo fuera más fácil y agradable y en especial agradecer la colaboración técnica de Erica Gil y M<sup>a</sup> Jesús Benito.

A la Dra. María Isabel Puga por su inestimable ayuda durante todo este tiempo.

A los servicios del CNB, en especial a Cultivo *in vitro*, Invernadero, Genómica y Fotografía que con su labor han contribuido al desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Crisanto Gutiérrez y a su grupo por su colaboración en todo lo relacionado con el ciclo celular.

A la Dra. Salomé Prat y a su grupo por su ayuda y colaboración en todo lo que respecta a giberelinas y brasinoesteroides.

Este trabajo se ha desarrollado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología, con la financiación de los proyectos BIO2002-03568 del Ministerio de Ciencia y Tecnología y EUI2008-03748 del Ministerio de Ciencia e Innovación.



## AGRADECIMIENTOS

A veces las palabras no son suficientes para expresar los sentimientos, pero aún así lo intentaré.

En primer lugar quiero agradecer a Javier Paz-Ares estos años de dedicación y dirección y su apoyo en los momentos en los que no veía la luz.

Gracias José Manuel por todo lo que me has enseñado, por estar ahí siempre que te he necesitado, por tu infinita paciencia y sobre todo por enseñarme lo que es hacer ciencia.

A todos mis compañeros de los laboratorios 311 y 312 que me han ayudado en todo momento compartiendo conmigo el día a día. Gracias por vuestra comprensión, vuestros ánimos y los sabios consejos que tanto me han ayudado. En este trabajo hay algo de cada uno de vosotros.

Gracias Mabel, que empezaste siendo compañera y te convertiste en mi amiga apoyándome de manera incondicional en todo momento, por prestarme tu hombro para llorar y compartir mis alegrías con tu sonrisa, por darme fuerzas cuando yo ya no las tenía, por el “todo llega” y al final llegó.

Gracias a los chicos del 315 por la ayuda prestada durante todo este tiempo. En especial quiero agradecer a Tamara, mi compi de Tesis, por compartir mis desvelos y dudas durante estos años.

Al Departamento de Genética Molecular de Plantas que tan bien me ha tratado.

A Marisa López, Carol, Vega, María y Patricia por el apoyo que he recibido, animándome a lo largo de todo este proceso.

A mis Padres, mis Hermanos y a Helena por la paciencia demostrada durante estos años. Sin vuestro apoyo no lo hubiera logrado.

Y por último y no menos importante, gracias Javier por aprender la diferencia entre un *northern* y un *western*, por aguantarme y quererme. Gracias, porque sé que a lo largo de este tiempo no ha sido fácil ni quererme ni entenderme y aún así has estado a mi lado de manera incondicional. Te quiero.





## **ABREVIATURAS**



**[<sup>35</sup>S]Met:** L-metionina <sup>35</sup>S

**[α-<sup>32</sup>P]dCTP:** desoxicitidina 5'-trifosfato α-<sup>32</sup>P

**[γ-<sup>32</sup>P]ATP:** adenosín trifosfato γ-<sup>32</sup>P

**3-AT:** 3-amino-1,2,4 triazol

**A:** adenina

**ABA:** ácido abscísico

**ADP:** adenosina difosfato

**Apdo:** apartado

**As(V):** arseniato

**ATP:** adenosín trifosfato

**BAP:** N6-Benziladenina

**cDNA:** DNA complementario

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DO:** densidad óptica

**EtBr:** bromuro de etidio

**Gb:** giberelina

**GFP:** proteína fluorescente verde procedente de *Aequorea victoria*

**H:** histidina

**HA:** epítipo procedente de la hemaglutinina (YPYDVPDYA)

**L:** leucina

**LB:** medio de cultivo de Luria-Bertani

**mA:** miliamperios

**MS:** medio de crecimiento de plantas de Murashige y Skoog

**NADP:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**P:** fósforo

**pb:** pares de bases

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PEPC:** fosfoenol piruvato carboxilasa

**Pi:** ortofosfato inorgánico

**PMSF:** fluoruro de fenil-metil-sulfonilo

**Po:** fósforo orgánico

**PPi:** pirofosfato

**PVDF:** fluoruro de polivinilideno

**RNA:** ácido ribonucleico

**rpm:** revoluciones por minuto

**rRNA:** RNA ribosómico

**RuBisCO:** ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa

**SDS:** dodecil sulfato sódico

**ufc:** unidades formadoras de colonias

**V:** voltios

**W:** triptófano

**Wt:** plantas de genotipo silvestre

## ÍNDICE



<b>RESUMEN/SUMMARY .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
1. EL FÓSFORO COMO NUTRIENTE EN LAS PLANTAS .....	7
2. ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS AL AYUNO DE Pi .....	8
2. 1 Modificaciones en el patrón de desarrollo de las plantas .....	8
2. 2 Modificaciones fisiológicas .....	9
2. 3 Modificaciones bioquímicas .....	9
2. 3. 1 Movilización y aprovechamiento del Pi endógeno y externo .....	10
2. 3. 2 Adaptaciones metabólicas endógenas al estrés de Pi .....	11
3. CONTROL DE LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS AL AYUNO DE Pi .....	14
3.1 Respuesta al estrés de Pi a nivel transcripcional.....	14
3.1.1 Regulación de la transcripción: los factores de transcripción .....	16
3.1.2 Regulación transcripcional durante el ayuno de Pi en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
3.1.3 Regulación transcripcional durante el ayuno de Pi en plantas .....	17
3.1.3.1 Familia MYB .....	18
3.1.3.2 Familia bHLH .....	19
3.1.3.3 Familia WRKY .....	21
3.1.3.4 Familia dedo de Zn .....	21
3.2 Otros genes reguladores de la respuesta .....	22
3.3 Regulación post-transcripcional .....	22
3.3.1 Sumoilación y ubiquitinación .....	22
3.3.2 microRNAs y genes no codificantes de proteínas .....	23
3.3.2 Control del tráfico intracelular de los transportadores de Pi .....	25
3.4 Señales hormonales .....	25
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	35
1.1 Estirpes microbiológicas .....	35
1.2 Plásmidos .....	35
1.3 Material vegetal .....	35
2. TIPOS DE CULTIVOS .....	35
2.1 Cultivo de microorganismos.....	35
2.2 Cultivo de plantas.....	36
2.2.1 Cultivo in vitro de <i>Arabidopsis</i> .....	36
2.2.2 Cultivo en tierra de <i>Arabidopsis</i> .....	37
2.2.3 Cruzamiento de <i>Arabidopsis</i> .....	37
3. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN .....	37
3.1 Transformación de microorganismos .....	37
3.2 Transformación de <i>Arabidopsis</i> .....	37
4. TECNOLOGÍA DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	38
4.1 Aislamiento, purificación y análisis de DNA .....	38
4.2 Aislamiento, purificación y análisis de RNA .....	38

5. CLONACIÓN.....	39
5.1 Clonajes para levaduras.....	39
5.2 Clonajes en el vector de entrada.....	40
5.3 Clonajes en los vectores binarios.....	40
5.4 Clonaje para la expresión de proteína recombinante en <i>E. coli</i> .....	41
6. DOS HÍBRIDOS POR CONJUGACIÓN EN LEVADURAS .....	41
7. TECNOLOGÍA DE PROTEÍNAS .....	42
7.1 Inducción y purificación de la proteína .....	42
7.2 Expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i> .....	42
7.3 Transcripción y traducción in vitro .....	43
7.4 Extracción y análisis de proteínas de plantas .....	43
7.5 Inmunoprecipitación .....	44
8. ENSAYO DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DEL DNA (EMSA) .....	45
9. DETERMINACIONES FISILÓGICAS .....	45
10. ANÁLISIS MICROSCÓPICOS.....	46
11. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICOS .....	46
12. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS .....	47
<b>RESULTADOS</b> .....	49
1. BÚSQUEDA DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA MEDIANTE EL ENSAYO DE LOS DOS HÍBRIDOS EN LEVADURAS .....	51
2. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN SPX1-bHLH149 EN LEVADURAS.....	55
3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA bHLH149 .....	56
4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>bHLH149</i> .....	59
4.1 Expresión de <i>bHLH149</i> durante el desarrollo .....	59
4.2. Expresión de <i>bHLH149</i> en respuesta al estrés por ayuno de Pi .....	61
4.3 Regulación hormonal de la expresión de <i>bHLH149</i> .....	62
5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA GFP-bHLH149.....	63
6. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN <i>bHLH149</i> .....	65
6.1. Caracterización fenotípica .....	66
6.2 Caracterización molecular .....	69
6.3. Niveles de Pi intracelular libre .....	71
6.4. Influencia de <i>bHLH149</i> en repuesta a hormonas.....	72
7. INTERACCIÓN DE bHLH149 CON OTROS COMPONENTES REGULADORES DE LA RUTA DE RESPUESTA AL AYUNO DE Pi.....	75
7.1 Interacción de bHLH149 con PHR1 y PHO2 .....	75
7.2 Estudio de la interacción de la proteína bHLH149 con SPX1.....	76
7.2.1 Interacción in planta de ambas proteínas.....	76
7.2.2 Interacciones genéticas entre <i>bHLH149</i> y <i>SPX1</i> .....	77
7.2.3 Análisis fisiológico de la interacción bHLH149-SPX1 .....	80



7.3 Estudio de la interacción de la proteína bHLH149 con PHO2 .....	83
7.3.1 Interacción in planta de ambas proteínas.....	83
7.3.2 Interacciones genéticas entre <i>bHLH149</i> y <i>PHO2</i> .....	84
7.3.3 Papel de PHO2 en la estabilidad de bHLH149.....	88
8. INTERACCIÓN DE bHLH149 CON OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA bHLH .....	89
9. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO .....	90
<b>DISCUSIÓN</b> .....	95
1. MULTIPLES PROCESOS BIOLÓGICOS POTENCIALMENTE REGULADOS POR SPX1 .....	97
2. LA ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN <i>bHLH149</i> AFECTA AL CRECIMIENTO DE LA PLANTA.....	98
3. POSIBLE PAPEL DE <i>bHLH149</i> EN LA SEÑALIZACIÓN HORMONAL .....	100
4. PAPEL DE <i>bHLH149</i> EN EL CONTROL DE LA SENESCENCIA.....	102
5. MECANISMO DE ACCIÓN E INTEGRACIÓN DE <i>bHLH149</i> EN LA RUTA DE AYUNO DE Pi .....	103
<b>CONCLUSIONES</b> .....	107
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	111



**RESUMEN/SUMMARY**



Las plantas a lo largo de la evolución han desarrollado una serie de sistemas adaptativos que les permite adecuar su crecimiento para hacer frente a situaciones de privación de fosfato (Pi), que implican cambios a nivel de desarrollo, fisiológicos, bioquímicos y moleculares. En este trabajo, se ha abordado la búsqueda de nuevos genes que intervengan en dicha respuesta adaptativa. Para lograr este fin, se han buscado proteínas que interaccionan con SPX1, un represor de las respuestas al ayuno de Pi, utilizando la técnica de los dos híbridos en levaduras. En este escrutinio se aisló el gen *bHLH149*, que codifica una proteína nuclear con características de factor transcripcional pero sin capacidad de unión a DNA. *bHLH149* interacciona *in vivo* con SPX1 de manera más eficiente durante el ayuno de Pi y con PHO2, otro gen regulador de la respuesta. Los niveles de acumulación de la proteína *bHLH149* en función de la cantidad de Pi del medio están regulados por SPX1 y PHO2. Así, en condiciones de suficiencia de fosfato, PHO2 actuaría como regulador negativo de la acumulación de *bHLH149* y durante la carencia de Pi SPX1 actuaría como regulador positivo de su acumulación. La alteración en los niveles de expresión de *bHLH149* provoca cambios en el tamaño de las células epidérmicas así como en la biomasa de la planta, indicando que este gen regula negativamente el tamaño celular, así como el porte de la planta. Este control se ejerce probablemente a través de la ruta de los brasinoesteroides, mediante la interferencia con los factores transcripcionales BEE1 y BEE2. De los resultados obtenidos se propone que *bHLH149* controla el crecimiento y la proliferación celular dependiente de la cantidad de Pi del medio.

Plants have evolved a number of adaptive responses to cope with growth in conditions of limited phosphate supply involving physiological, metabolic and developmental changes. Our approach was to search for new genes that participate in this pathway. To achieve this goal, we searched for proteins interacting with SPX1, a repressor of phosphate starvation responses, using the yeast two hybrid technology. In this screening we isolated *bHLH149*, a gene encoding a nuclear non-DNA binding protein, which interacts with SPX1 *in vivo* more efficiently during phosphate starvation, and also with PHO2, another key regulatory gene of the signalling pathway. The bHLH149 protein accumulation depends upon the phosphate content during growth and is regulated by SPX1 and PHO2. During normal phosphate supply, PHO2 would act as a negative regulator of bHLH149 protein accumulation, whereas during phosphate starvation SPX1 would act as a positive regulator of its accumulation. The alteration of *bHLH149* expression leads to changes in the size of the epidermal cells as well as in the plant biomass, indicating that this gene regulates negatively, both the cellular size and biomass. This control is exercised probably by the regulation of the brassinosteroid pathway, through the interaction with BEE1 and BEE2, which prevents the binding of these proteins to the DNA. Our results indicate that the control of cell growth and division by *bHLH149* is dependent on the phosphate content of the medium.

# **INTRODUCCIÓN**





Las plantas están sometidas a un conjunto de condiciones externas que afectan a su crecimiento, desarrollo y capacidad reproductora. Cuando las condiciones ambientales son subóptimas se genera una situación de estrés cuyo resultado final es una merma en la producción agrícola, en el caso de las plantas cultivadas. Uno de los tipos de estrés abiótico más importantes lo constituyen las deficiencias nutricionales. Sin embargo, en el contexto de la agricultura en países desarrollados, las pérdidas sufridas por las deficiencias nutricionales no se han considerado graves, ya que el sencillo aporte de fertilizantes es suficiente para paliar su déficit. No obstante, el abuso en la utilización de fertilizantes en la agricultura tiene varios efectos adversos. Además del coste económico, que se está incrementando considerablemente en los últimos años, la aplicación en exceso de fertilizantes tiene un enorme impacto medioambiental por sus efectos nocivos en la calidad de las aguas. Por otro lado, algunos nutrientes como el fósforo, constituyen en la práctica un recurso no renovable, cuyas fuentes minerales con bajo coste de extracción se están agotando (Gilbert, 2009). Es, por tanto, uno de los retos de la biotecnología conocer en profundidad las bases moleculares de las respuestas de las plantas frente a las deficiencias nutricionales y aprovechar este conocimiento para conseguir cultivos que aprovechen de forma más eficiente los nutrientes del suelo.

## **1. EL FÓSFORO COMO NUTRIENTE EN LAS PLANTAS**

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para las plantas, cuyo contenido total oscila entre 0,05 y 0,5% del peso seco de la planta y juega un papel fundamental en una gran cantidad de procesos celulares, tales como: generación de energía, síntesis de ácidos nucleicos, fotosíntesis, respiración, síntesis y estabilidad de membranas, activación/desactivación de enzimas, señalización y metabolismo de glúcidos (Marschner, 1995). A pesar de que este mineral es bastante abundante en la litosfera es, frecuentemente, un factor limitante en la productividad. Este hecho se debe a que las plantas absorben el P como ortofosfato inorgánico (Pi), y éste se encuentra en más del 80% formando complejos con moléculas orgánicas o con sales insolubles, fundamentalmente de  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en suelos ácidos y  $\text{Ca}^{2+}$  en suelos calcáreos. Todo esto contribuye a que la concentración de fosfato inorgánico libre en el suelo sea frecuentemente entre 1.000 y 10.000 veces inferior que en el interior celular (Holford, 1997). Esto ha obligado a que las plantas y otros organismos que obtienen el Pi del suelo dispongan de sistemas eficientes para su absorción mediante transporte activo en

contra de gradiente, así como numerosos mecanismos celulares para mantener constante el contenido de Pi intracelular.

## **2. ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS AL AYUNO DE Pi**

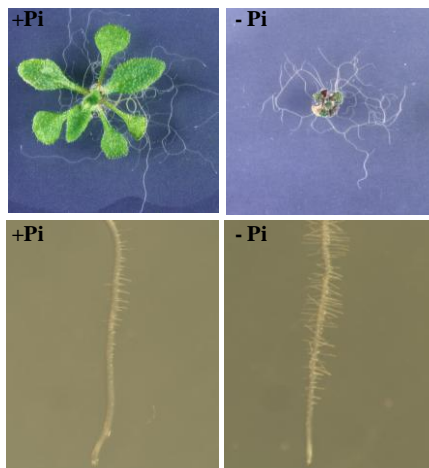
Las plantas han desarrollado una serie de sistemas adaptativos que les permiten adecuar su crecimiento para hacer frente a situaciones de privación de Pi, que implican cambios a nivel de desarrollo, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (revisado en Raghothama, 1999; Abel y col., 2002; Rausch y Bucher, 2002; Vance y col., 2003, Franco-Zorrilla y col., 2004; Ticconi y Abel, 2004; Rouached y col., 2010). A continuación, se revisan los conocimientos actuales sobre la respuesta de las plantas a esta carencia nutricional. Cabe destacar que *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) comparte la mayoría de las respuestas adaptativas con el resto de las especies vegetales, por lo que la mayor parte del conocimiento que se posee acerca de las respuestas al ayuno de Pi, en particular fisiológico, bioquímico y molecular, proceden del estudio de esta especie, debido a la gran cantidad de herramientas genéticas, genómicas y proteómicas disponibles.

### **2.1 Modificaciones en el patrón de desarrollo de las plantas**

Las adaptaciones relacionadas con el desarrollo afectan fundamentalmente a la arquitectura de la raíz, orientadas a aumentar la superficie de contacto con el suelo. Estos cambios incluyen un incremento en la tasa de crecimiento de la raíz con respecto a la parte aérea, gracias a un aumento en el número y en la longitud de raíces laterales, si bien existe una disminución en el crecimiento de la raíz principal. Asimismo, se produce un aumento en el número y en longitud de los pelos radiculares (Figura 1) (Bates y Lynch, 1996; Ma y col., 2001; Williamson y col., 2001; López-Bucio y col., 2003). Mediante estas estrategias se aumenta la superficie de contacto entre la raíz y el suelo (rizosfera), fundamentalmente en las capas más superficiales del suelo, que es donde se encuentra mayoritariamente el Pi libre.

Una respuesta adaptativa común a numerosas especies de plantas, fundamentalmente de la familia *Proteaceae*, es la formación de estructuras especializadas en la movilización y captación de Pi del suelo. Dichas estructuras, denominadas proteoides, son agrupaciones de raíces laterales con numerosos pelos que

emergen del periciclo (López-Bucio y col., 2003). Por otro lado, la mayor parte de las especies vegetales, son capaces de establecer interacciones simbióticas con hongos micorrizógenos que aumentan la capacidad de absorción del Pi (Harrison, 1999; Bucher, 2007).



**Figura 1** Crecimiento de la roseta de plantas cultivadas en medio completo (+Pi) a la izquierda y en medio sin Pi (-Pi) (derecha). En la parte inferior se detalla el crecimiento los pelos radiculares de plantas cultivadas durante 7 días en placas verticales en medio completo (+Pi) y sin Pi (-Pi).

## 2. 2 Modificaciones fisiológicas

Bajo situaciones moderadamente carenciales de Pi, o bien en estadíos tempranos del estrés, las plantas tienden a mantener constantes los niveles de Pi citosólico a expensas del almacenado en la vacuola. Cuando la situación de ayuno perdura, el Pi citosólico disminuye, por lo que se disparan una serie de respuestas que implican la movilización de Pi de las hojas más viejas a las más jóvenes, así como de la parte aérea a la raíz, que pasa a funcionar como sumidero de Pi y otros nutrientes como glúcidos (Adalsteinsson y Jensen, 1990; Raghothama, 1999). Ambos procesos contribuyen al incremento del crecimiento de la raíz en relación a la parte aérea característico de la respuesta al ayuno de Pi, lo que contribuye a la mejor absorción de dicho macronutriente.

## 2. 3 Modificaciones bioquímicas

Los cambios a nivel bioquímico responden principalmente a dos objetivos: aumentar la disponibilidad de Pi endógeno y el presente en el suelo, y la adaptación metabólica al estrés nutricional.

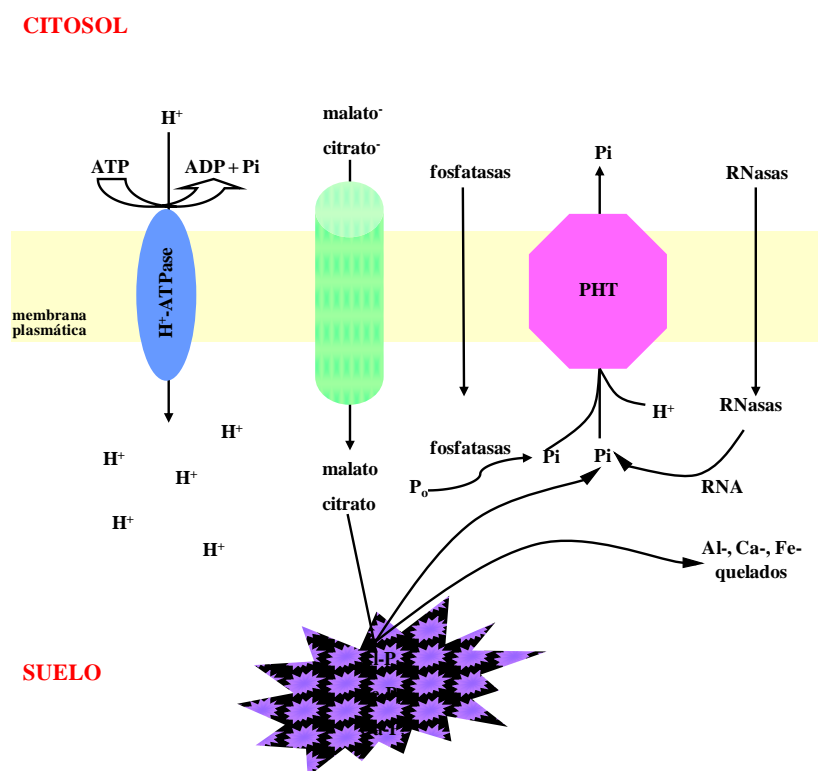
### **2. 3. 1 Movilización y aprovechamiento del Pi endógeno y externo**

La movilización y aprovechamiento del Pi implica la inducción de transportadores de Pi de alta afinidad, así como la secreción de ácidos orgánicos, protones, fosfatasas y ribonucleasas (RNAsas; Raghothama, 1999; Vance y col., 2003).

El Pi que se encuentra en disolución en el suelo llega mediante difusión a la superficie de la raíz, donde es interiorizado rápidamente por transporte activo, provocando una depleción local del nutriente y aumentando con ello la tasa de difusión a la rizosfera (Barber y col., 1963; Holford, 1997; Comerford, 1998; Hinsinger, 2001). Aunque el Pi en el suelo raramente sobrepasa concentraciones de 2  $\mu\text{M}$ , en el interior de las células alcanza valores entre 2-20 mM (Bielecki, 1973; Schachtman y col., 1998). Debido a estas diferencias y al potencial negativo de la membrana plasmática, se requiere un transporte activo para la entrada del Pi, que va acompañado de un cotransporte de cationes  $\text{H}^+$  (Schachtman y col., 1998; Reid y col., 2000). Diversos estudios demuestran que las plantas poseen un sistema de transporte para la captación del Pi del suelo (Bielecki, 1973; Smith y col., 2000; Lambers y col., 2006; Catarcha y col., 2007). Los transportadores se encuentran localizados en la membrana plasmática de las células epidérmicas específicamente en los pelos radiculares, sugiriendo su importancia en la adquisición de Pi soluble en el medio (Daram y col., 1998; Chiou y col., 2001). Una vez interiorizado, el Pi se mueve a través del simplasto hasta llegar al xilema, a través del cual se distribuye al resto de la planta. En el interior de las células sumidero, el Pi es transportado en contra de gradiente mediante transportadores de baja afinidad a los cloroplastos y mitocondrias (Versaw y col., 2002). Además, el Pi se transporta del citoplasma hacia la vacuola y de la vacuola al citoplasma como mecanismo de homeostasis de Pi citosólico (Mimura, 1999).

Por otra parte, en condiciones de carencia de Pi, las plantas secretan a la rizosfera ácidos orgánicos derivados del ciclo de Krebs, fundamentalmente ácido málico y cítrico (Figura 2). Estos compuestos desplazan el Pi de las moléculas de las que forma parte, ya que son capaces de quelar cationes tales como  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  incrementando así la solubilidad del Pi (Jones, 1998; Hinsinger, 2001; Ryan y col., 2001). Además, la secreción de ácidos contribuye a controlar la acidez intracelular (Raven y Smith, 1976). Dicho efecto sobre el pH intracelular podría ser un modo de permitir la actividad glucolítica en condiciones de carencia de Pi a través del enzima PEPC, que requiere un pH básico para su óptimo funcionamiento (Sakano, 2001).

Otro mecanismo general de las plantas para incrementar la disponibilidad de Pi intracelular y extracelular consiste en la inducción de enzimas movilizadoras de Pi, tales como fosfatasas y RNasas, algunas de las cuales se secretan al exterior celular. En particular, el genoma de *Arabidopsis* codifica 29 fosfatasas ácidas, la mayoría de cuyos genes se inducen bajo privación de Pi (del Pozo y col., 1999; Li y col., 2002). En cuanto a las RNasas, su importancia estriba en su capacidad de degradar ácidos ribonucleicos, contribuyendo de este modo a la movilización de Pi. Al igual que las fosfatasas, las RNasas también se inducen en respuesta a otros estreses relacionados con la movilización de Pi. En *Arabidopsis*, *RNS1*, *RNS2* y *RNS3* incrementan su expresión en tejidos senescentes y, adicionalmente, *RNS1* y *RNS2* en respuesta al ayuno de Pi (Taylor y col., 1993; Bariola y col., 1994).



**Figura 2** Esquema de los procesos de solubilización y absorción del fosfato inorgánico (Pi) y movilización del fosfato orgánico (P<sub>o</sub>) en el suelo.

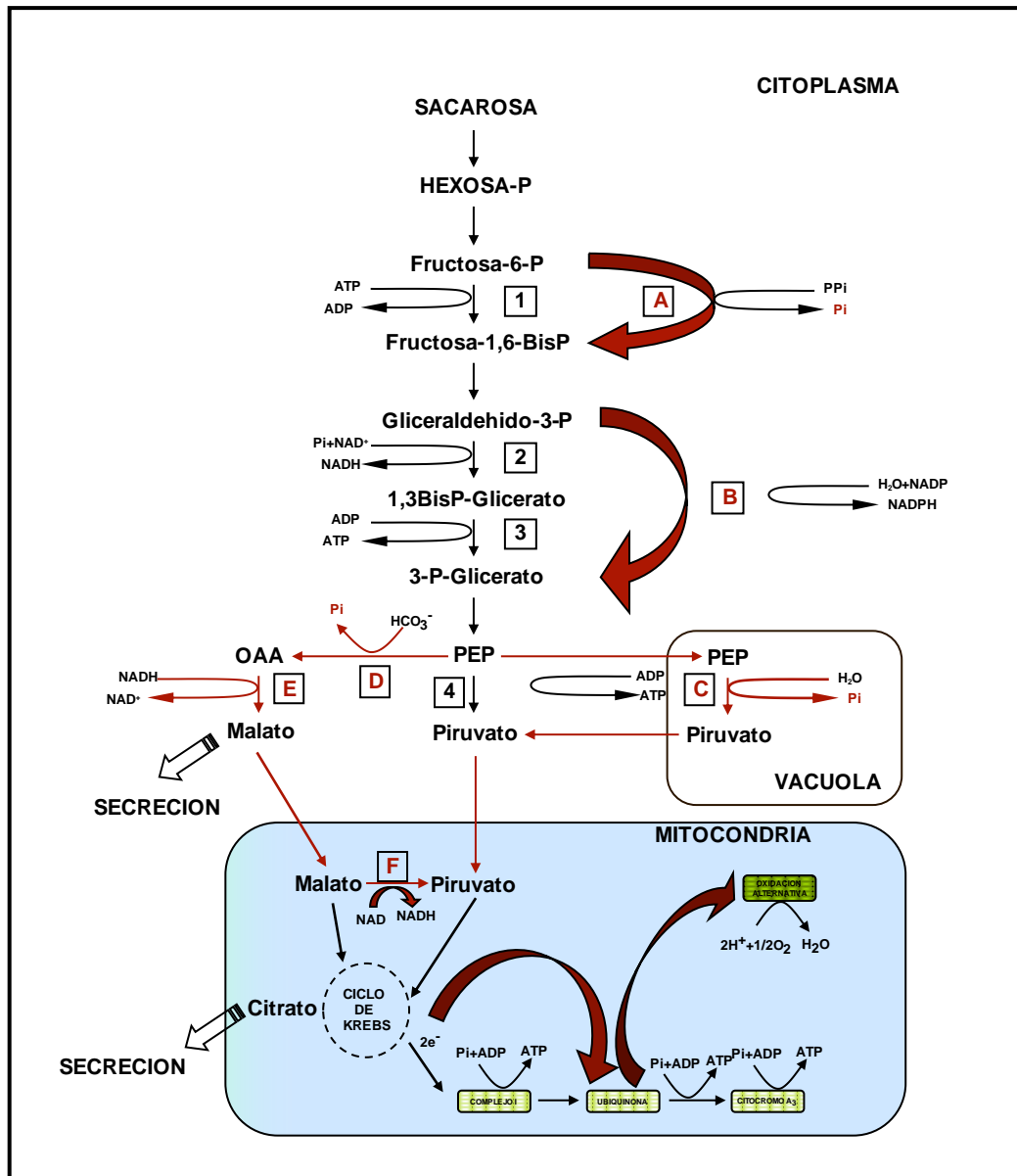
### 2. 3. 2 Adaptaciones metabólicas endógenas al estrés de Pi

En respuesta al ayuno de Pi se produce una serie de adaptaciones metabólicas que tienen por objeto asegurar el correcto funcionamiento de las células en condiciones de bajo Pi intracelular. Estas adaptaciones están encaminadas a reducir los requerimientos de Pi, e implican la utilización de rutas alternativas en la glucólisis y en

la respiración oxidativa (Duff y col., 1989), así como cambios en la síntesis de almidón y metabolitos secundarios, y en la composición lipídica de las membranas tilacoidales (Essigmann y col., 1998). En cuanto a la ruta alternativa de la glucólisis, el ayuno de Pi provoca la disminución de ATP y ADP, mientras que la concentración de pirofosfato (PPi) se mantiene más estable (Theodorou y Plaxton, 1993). Por ello, las etapas de la glucólisis que necesitan Pi o adenilatos, pueden ser sustituidas por otras que en su lugar precisen PPi o  $\text{NADP}^+$ , con la finalidad de asegurar la producción de moléculas orgánicas (Figura 3). La respiración mitocondrial también se encuentra afectada por la deficiencia de Pi en el medio. En dichas condiciones se produce un incremento en la relación  $\text{ATP}/(\text{ADP} + \text{Pi})$ , a pesar de que la cantidad de cada uno de ellos disminuye (Bryce y col., 1990). Este fenómeno provoca la inhibición de la fosforilación oxidativa debido a una reducción de la actividad de la citocromo oxidasa, que requiere  $\text{ADP} + \text{Pi}$  para su funcionamiento. Este hecho supone una disminución del transporte de electrones a través de la ruta del citocromo. El empleo de vías alternativas de oxidación no fosforilativa ayuda a mantener el estado redox en la célula (Rychter y col., 1992).

El metabolismo primario también sufre variaciones en función de la concentración de Pi, afectando a la síntesis de almidón y a la tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  (Fredeen y col., 1990). La falta de Pi impide la salida de triosas-fosfato del cloroplasto al citoplasma. Dado que las triosas-fosfato y el Pi son efectores positivo y negativo, respectivamente, de la ADP-glucosa pirofosforilasa, enzima limitante en la síntesis de almidón, la carencia de Pi tiene como resultado una acumulación de almidón en el interior del cloroplasto. Por otro lado, la tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  se ve reducida debido a una disminución en la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato, a causa de la reducción de la actividad de la RuBisCO dependiente de ATP y de la cantidad de triosas-fosfato en el estroma.

En condiciones de estrés nutricional, el metabolismo secundario cobra vital importancia en las plantas. En situaciones en la que existe deficiencia de Pi, es habitual la acumulación de metabolitos secundarios tales como antocianinas, que protegen a los cloroplastos de la fotoinhibición resultante de las reacciones fotoquímicas derivadas de la fotosíntesis (Takahashi y col., 1991; Trull y col., 1997).



**Figura 3** Modelo de las rutas alternativas en la glucólisis y en la respiración mitocondrial en plantas sometidas a ayuno de Pi. Las flechas rojas muestran las rutas alternativas que permiten sortear los enzimas que utilizan adelinato y/o Pi. Las enzimas implicadas en dichas rutas se presentan en rojo: A, fructosa-6-P 1-fosfotransferasa; B, NADP-gliceraldehido-3-P deshidrogenasa no fosforilativa; C, fosfoenolpiruvato fosfatasa vacuolar; D, fosfoenolpiruvato carboxilasa; E, malato deshidrogenasa; F, enzima málica. Las enzimas que median las reacciones convencionales se indican con números negros: 1, fosfofructoquinasa; 2, NAD-gliceraldehido-3-P deshidrogenasa fosforilativa; 3, fosfoglicerato quinasa; 4, piruvato quinasa citosólica.

Durante el ayuno por fósforo también se modifica la composición lipídica de las membranas tilacoidales, compensándose la reducción en la cantidad de fosfolípidos con un aumento en sulfolípidos y mono- y di-galactolípidos. Estos cambios suponen el mantenimiento de la integridad de las membranas en condiciones en las que el Pi es escaso (Essigmann y col., 1998; Yu y col., 2002). Aunque los galactolípidos se

encuentran típicamente en las membranas tilacoidales, se ha propuesto que rempazan a los fosfolípidos incluso en la membrana plasmática en condiciones de carencia de Pi. Esto se debe a que, durante el ayuno, los productos de la hidrólisis de los fosfolípidos además de constituir una fuente de Pi, actúan como sustratos para la síntesis de galactolípidos (Cruz-Ramírez y col., 2006).

### **3. CONTROL DE LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS AL AYUNO DE Pi**

Aunque existe una gran cantidad de información disponible acerca del control de la respuesta a estrés por deficiencia Pi en bacterias (Hulett, 1996; Lamarche y col., 2008) y levaduras (Mouillon y Persson, 2006), en plantas este sistema de regulación y su complejidad comienza a ser desentramado, en parte gracias a las aproximaciones genéticas y a los estudios transcripcionales de genomas completos. Además, las plantas son sistemas biológicos complejos, en los que la regulación de las respuestas al estrés nutricional debe estar coordinada en los diferentes órganos y tipos celulares, lo que implica la existencia de señales de regulación a larga distancia. En la actualidad se conoce que el control más importante de la respuesta frente al estrés se realiza a nivel transcripcional fundamentalmente a través del concurso de los factores de transcripción. No obstante se han identificado otras proteínas implicadas en la respuesta así como mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional. Además, hay evidencias de la implicación de diversas señales hormonales en la respuesta frente al estrés nutricional.

#### **3.1 Respuesta al estrés de Pi a nivel transcripcional**

Inicialmente, los estudios de expresión génica se centraron en el análisis de la expresión de genes presumiblemente implicados en la defensa frente al estrés (tales como RNasas, fosfatasas y transportadores de Pi de alta afinidad) o en escrutinios diferenciales de genotecas de cDNA (Burleigh y Harrison, 1998; del Pozo y col., 1999; Martín y col., 2000). Estos estudios han mostrado que muchos de los genes del sistema de respuesta frente al ayuno están regulados a nivel transcripcional, por lo que se ha propuesto la existencia en plantas de un sistema de salvamento inducible por ayuno que responde a un mecanismo regulador común.

El desarrollo de micromatrices y su uso para el análisis de los perfiles transcripcionales frente a un estímulo en especies modelo, ha revelado que el genoma es dinámico y responde globalmente a señales ambientales. La fuente principal de este

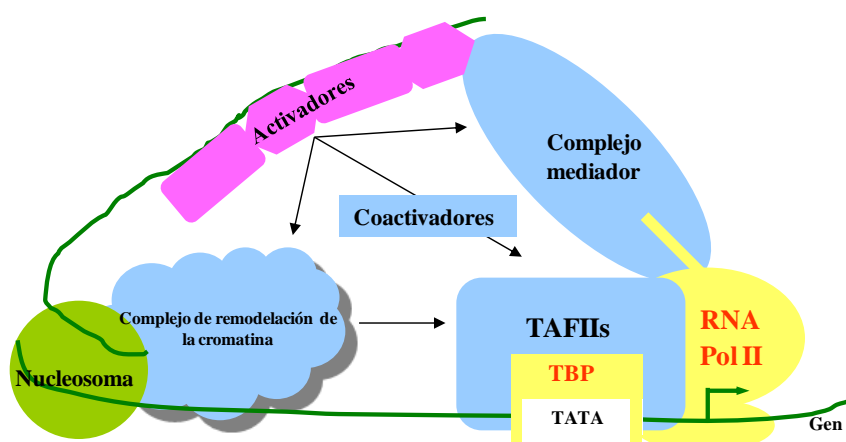


dinamismo, tanto cuantitativamente como cualitativamente, se debe a la acción de los factores de transcripción específicos. En sistemas complejos, la regulación de la expresión génica es el resultado de la actividad de diferentes factores de transcripción, componiendo una compleja red de interacciones moleculares responsables de elaborar un programa transcripcional frente a un estímulo. En los últimos años se han descrito varios análisis globales de la actividad transcripcional durante el ayuno de Pi (Misson y col. 2005; Morcuende y col., 2007; Müller y col., 2007; Calderón-Vázquez y col., 2008; Bustos y col., 2010). Estos estudios han puesto de manifiesto la relevancia del estricto control transcripcional a la que está sometida esta respuesta, ya que aproximadamente 4100 genes tienen alterada significativamente su expresión tras el estrés nutricional (aproximadamente 2100 genes se inducen y 2000 se reprimen) (Bustos y col., 2010). Entre los genes con niveles más elevados de inducción están los que corresponden a proteínas relacionadas con los sistemas de defensa frente a la carencia de Pi como fosfatasas, RNasas y transportadores de Pi, así como enzimas de síntesis de ácidos orgánicos, de metabolismo de lípidos y de síntesis de glúcidos. De la misma manera, se produce una activación del metabolismo secundario (antocianinas y flavonoides). Respecto a los genes cuya transcripción disminuye significativamente durante el estrés se encuentran los relacionados con la fotosíntesis (tanto de la fase oscura como la lumínica), síntesis de clorofilas, de la fotorrespiración, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, así como genes relacionados con el ciclo y división celular (Misson y col., 2005; Morcuende y col., 2007; Bustos y col., 2010).

Algunos autores han postulado la existencia de dos tipos de programas frente al estrés de Pi en función del momento de actuación (Hammond y col., 2003). El primero de ellos actuaría transitoriamente durante las etapas más tempranas del ayuno, e implicaría a genes relacionados con la respuesta general frente al estrés. El segundo programa comprendería a los genes más específicos del ayuno de Pi (Hammond y col., 2003). Esta idea está además apoyada por el análisis del transcriptoma de raíces de plantas de tomate sometidas a diferentes deficiencias nutricionales (Pi, K y Fe). En este caso, muchos de los genes que se inducen tempranamente se activan por los tres estreses, poniendo de manifiesto una interacción entre las rutas de señalización de los distintos estreses para el mantenimiento de la homeostasis mineral en la célula y en la planta (Wang y col., 2002).

### 3.1.1 Regulación de la transcripción: los factores de transcripción

La regulación de la expresión génica en eucariotas se realiza a través del núcleo del promotor y de los factores de transcripción, tanto generales como específicos. El núcleo del promotor de un gen marca el punto de anclaje para la RNA Polimerasa II y la maquinaria general de transcripción (factores de transcripción generales). Para que esta interacción se produzca de manera adecuada es necesaria la participación de factores de transcripción específicos que, mediante su unión a secuencias *cis*-reguladoras, modulan el inicio de la transcripción del gen diana de manera específica (Carey y Smale, 2000). Además, es necesaria la participación de co-activadores y co-represores que modulan a la maquinaria general directamente a través de la interacción con los factores de transcripción específicos o indirectamente modificando la estructura de la cromatina (Stargell y Struhl, 1996) (Figura 4). Los factores de transcripción específicos presentan un dominio de unión a DNA y en base a la similitud de dicho dominio se han clasificado en diversas familias (Riechmann y col., 2000).

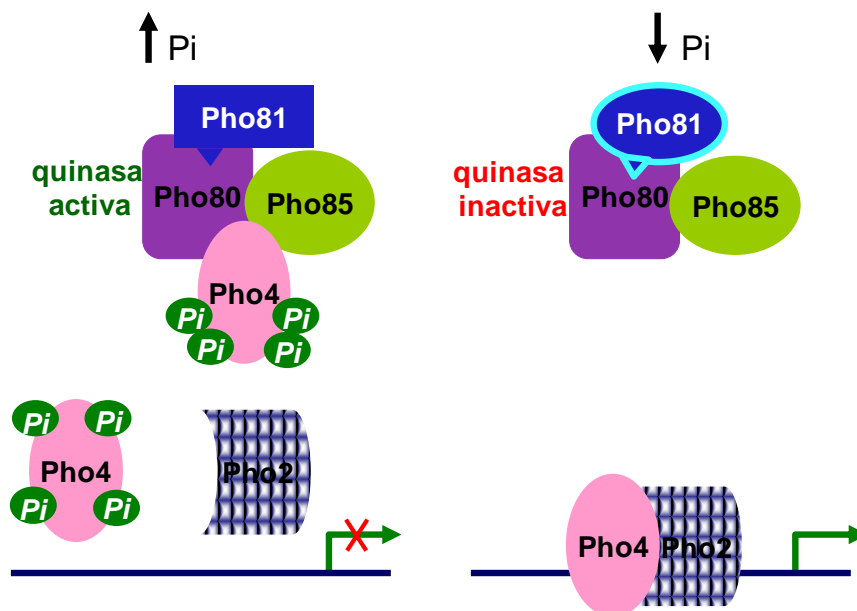


**Figura 4** Modelo de la regulación transcripcional en eucariotas. Los coactivadores (en azul) son reclutados por los activadores unidos al promotor (en rosa) para remodelar la estructura de la cromatina (nucleosoma) y estimular la actividad de la maquinaria general de transcripción (en amarillo; factores de transcripción generales).

### 3.1.2 Regulación transcripcional durante el ayuno de Pi en *Saccharomyces cerevisiae*

El sistema eucariota en el que más se ha estudiado el control transcripcional de la respuesta al ayuno de Pi es *Saccharomyces cerevisiae*. El control de la transcripción depende de dos factores de transcripción, PHO2 y PHO4, pertenecientes respectivamente a las familias de homeodominio y básico hélice-giro-hélice (bHLH) (Lenburg y O'Shea, 1996; Ogawa y col., 2000; Wykoff y O'Shea, 2001). Cuando la

concentración de Pi en el medio, y por tanto en la célula, es elevada, el complejo PHO80 (ciclina)/PHO85 (quinasa dependiente de ciclina) fosforila a PHO4, impidiendo su translocación al núcleo. Además la fosforilación de PHO4 evita la interacción con PHO2, necesaria para la activación transcripcional del regulón, que permite la adaptación a condiciones de bajo aporte de Pi. Cuando el Pi es limitante, PHO81 (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina con dominio SPX) inhibe al complejo PHO80/PHO85, por lo que PHO4 se desfosforila, se transporta al núcleo y se une a PHO2 para activar los genes del regulón (Figura 5), mediante el reconocimiento de secuencias *cis*-específicas.



**Figura 5** Regulación de la expresión de genes inducibles por la carencia de Pi en *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.1.3 Regulación transcripcional durante el ayuno de Pi en plantas

La respuesta frente a la carencia de Pi en plantas es bastante más compleja que en levaduras. En *Arabidopsis* el factor de transcripción PHR1 juega un papel central en el control de las respuestas frente al ayuno de Pi (Rubio y col., 2001; Bustos y col., 2010). La proteína PHR1 controla a nivel transcripcional la mayoría de las repuestas de activación de genes que contribuyen en la adaptación al estrés (Bustos y col., 2010). Además de *PHR1*, se han descrito otros factores de transcripción implicados en la modulación de la respuesta, aunque no se ha establecido su posición exacta en la ruta de señalización. Por otro lado, aunque la transcripción de *PHR1* no depende de la cantidad de Pi en la que se hayan cultivado las plantas (Rubio y col., 2001), el resto de los

factores de transcripción descritos responden a nivel transcripcional al estatus de Pi del medio, lo que apuntaría que actúan aguas abajo de *PHR1*. Hasta la fecha, los factores de transcripción implicados en la respuesta frente al ayuno de Pi son: *PHR1*, *MYB62* y *PHL1* (familia MYB; Rubio y col., 2001; Devaiah y col., 2009; Bustos y col., 2010), *bHLH32* y *OsPTF1* (familia bHLH; Chen y col., 2007; Yi y col., 2005), *WRKY75* (familia WRKY; Devaiah y col., 2007a) y *ZAT6* (dedo de Zinc tipo C2H2; Devaiah y col., 2007b). A continuación se revisa la información que se posee sobre dichos factores de transcripción, agrupados por familias.

### **3.1.3.1 Familia MYB**

Las proteínas MYB representan una de las familias de factores de transcripción más abundantes (Stracke y col., 2001). Se caracterizan por tener hasta tres repeticiones imperfectas de 53 aminoácidos denominados dominios MYB R1, R2 y R3, los cuales se unen a secuencias específicas del DNA. La mayor parte de estos factores de transcripción se agrupan dentro de la subfamilia R2R3 (Romero y col., 1998). En relación a la respuesta frente al estrés por deficiencia de Pi se han identificado tres miembros de esta familia: *PHR1*, *MYB62* y *PHL1*.

El primero de los factores de transcripción descritos en plantas en relación a la carencia de Pi fue *PHR1*, una proteína de tipo MYB con una sola repetición (Rubio y col., 2001). Esta proteína fue identificada mediante el estudio de mutantes de *Arabidopsis* con la respuesta frente a la carencia de Pi alterada. El mutante *phr1* muestra una expresión reducida de varios genes que responden a la carencia de Pi, no acumula antocianinas durante el estrés y la relación raíz/parte aérea está reducida, indicando que es un regulador positivo de la respuesta (Rubio y col., 2001). El hecho de que la falta de antocianinas en el mutante sea exclusiva de la carencia de Pi y no de otros estreses indica que el control de las respuestas compartidas por distintos estreses se puede llevar a cabo parcialmente mediante sistemas reguladores independientes. *PHR1*, además del dominio de tipo MYB, posee un segundo dominio *coiled-coil*, posiblemente implicado en interacciones proteína-proteína. Este tipo de factores de transcripción en *Arabidopsis* está representado por 15 miembros, por lo que existe la posibilidad de redundancia funcional entre ellos, lo que podría explicar el hecho de que la mutación *phr1* no provoque la ausencia total de la respuesta a la carencia de Pi. De hecho, uno de los miembros de esta familia, *PHL1*, actúa de forma redundante y sinérgicamente con *PHR1* en la respuesta frente al ayuno de Pi (Bustos y col., 2010). *PHR1* se une como un

dímero a una secuencia palindrómica imperfecta (Caja P1BS; GNATATNC) presente en los promotores de muchos de los genes que se inducen en la respuesta al estrés (Rubio y col., 2001; Franco-Zorrilla y col., 2004).

Recientemente se ha implicado en la participación de esta respuesta al miembro de la subfamilia R2R3, *MYB62*. Este gen, además de controlar negativamente la inducción de algunos de los genes de respuesta a la carencia de Pi, también regula negativamente la síntesis de giberelinas y algunos de los genes implicados en la transición y desarrollo floral como el *SOC1* y *SUP*. Se postula que este gen estaría implicado en la integración del estrés nutricional y de las respuestas a nivel de desarrollo (Devaiah y col., 2009).

### 3.1.3.2 Familia bHLH

En los últimos años se ha descrito la participación en la modulación de la respuesta al ayuno de Pi de dos miembros de la familia bHLH, uno en *Arabidopsis* (*bHLH32*; Chen y col., 2007) y otro en arroz (*OsPTF1*; Yi y col., 2005). Esta familia se caracteriza por tener un dominio básico hélice-giro-hélice (bHLH), altamente conservado y presente de manera ubicua en todos los eucariotas. El dominio bHLH está formado por aproximadamente 60 aminoácidos divididos en dos regiones funcionalmente distintas: una implicada en la unión al DNA (región básica) y otra en la dimerización con otras proteínas (región HLH). La región básica está formada por aproximadamente 15 aminoácidos con un alto número de residuos básicos. La segunda región consta de dos  $\alpha$ -hélices anfipáticas separadas por un giro de longitud variable (Li y col., 2006). Las dos  $\alpha$ -hélices promueven la dimerización permitiendo la formación de homodímeros y heterodímeros entre distintos miembros de la familia así como con proteínas de otras familias como las de tipo MYB (Littlewood y Evan, 1998).

La secuenciación del genoma de varias especies ha revelado que la familia bHLH es muy numerosa. En particular se han identificado 147 proteínas bHLH en *Arabidopsis*. Toledo-Ortiz y col. (2003) han clasificado a todos sus miembros en función de su capacidad de unión al DNA, basándose en el análisis de la secuencia de aminoácidos del dominio básico. Esto ha sido posible gracias a la información obtenida del estudio de proteínas bHLH de otros organismos, en relación a la capacidad de unión a DNA de distintos miembros así como del análisis de sus estructuras terciarias. De esta manera se han establecido dos grandes grupos: proteínas con capacidad de unión y sin capacidad de unión al DNA (Tabla 1).

**Tabla 1** Clasificación de proteínas bHLH de *Arabidopsis* en función de su capacidad de unión a DNA basado en el análisis de la secuencia aminoacídica del dominio básico. Adaptado de Toledo-Ortíz y col., (2003).

Unión a DNA	Nº proteínas	Dominio básico
con capacidad de unión		>= 5 residuos básicos
-unión al motivo E		
unión al motivo G (CACGTG)	89	Lys/His9 Glu13/Arg16
unión al motivo “no-G”	20	Glu13/Arg16
-unión al motivo “no-E” (NACGTG o NGCGTG)	11	Sin Glu13/Arg16
sin capacidad de unión	27	< 5 residuos básicos

En *Arabidopsis* las proteínas bHLH que se unen a DNA participan en una gran cantidad de procesos como por ejemplo la respuesta frente a frío (ICE1; Miura y col., 2007), a hormonas (MYC2; Lorenzo y col., 2004; Boter y col., 2004; ATBS1; Wang y col., 2009), en el desarrollo de tricomas, iniciación de los pelos radicales y en la producción de la capa mucilaginoso de la semilla (GL3 y EGL3; Gao y col., 2008). Por otra parte, en respuesta a estrés nutricional se han descrito diversas proteínas bHLH que intervienen en la respuesta frente a la carencia de Fe y de Pi. El gen *FIT* en *Arabidopsis* (Bauer y col., 2007) y su ortólogo *FER* en tomate (Brumbarova y col., 2005) inducen la transcripción de genes de respuesta a la carencia de hierro. Dicha respuesta también está modulada por bHLHs en arroz (Ogo y col., 2007) y en cebada (Ogo y col., 2006 y 2007).

Además, se ha descrito la función de diversas proteínas bHLH sin capacidad de unión a DNA. Estas proteínas actúan como reguladores negativos de la unión de otras proteínas bHLH con el DNA mediante la formación de heterodímeros (Massari y Murre, 2000). Entre otros, se ha caracterizado KIDARI como represor de HFR1 (Hyun y Lee, 2006), PAR1 y PAR2 como represores transcripcionales de genes de respuesta a auxinas y a brasinoesteroides (Bou-Torrent y col., 2008) y la subfamilia AIF que regula negativamente la señalización de brasinoesteroides mediante la unión con ATBS1 (Wang y col., 2009).

En relación a la respuesta por carencia de Pi se ha caracterizado el gen *bHLH32* cuya transcripción aumenta durante el ayuno de dicho nutriente (Chen y col., 2007). Se ha postulado que dicho gen actuaría como regulador negativo de algunas de las respuestas que se producen durante el estrés de Pi tales como la producción de

antocianinas y la formación de pelos radiculares (Chen y col., 2007). En arroz se ha descrito que el gen *OsPTF1* participa en la tolerancia por carencia de Pi, aunque no controla todos los aspectos de la respuesta (Yi y col., 2005).

### 3.1.3.3 Familia WRKY

La familia WRKY es específica de plantas, y comprende a proteínas que poseen el dominio homónimo, caracterizado por la presencia de los residuos conservados WRKYGQK y un motivo similar al dedo de Zn (Eulgem y col., 2000). Los miembros de esta familia participan en procesos tales como: defensa frente a patógenos (Dong y col., 2003), senescencia (Miao y col., 2004), respuesta a sequía, frío, salinidad (Seki y col., 2002) y respuesta frente a la carencia de Pi (Devaiah y col., 2007a; Chen y col., 2009). El gen *WRKY75* se induce durante el estrés por ayuno de Pi y se ha postulado su implicación en el control de la respuesta frente al estrés y en la regulación de la arquitectura radicular independiente de la concentración de Pi del medio (Devaiah y col., 2007a). Además, recientemente, se ha descrito la participación de *WRKY6* y *WRKY42* en la respuesta frente al ayuno por Pi (Chen y col., 2009). El mecanismo de acción propuesto se basa en que ambas proteínas se unen al promotor del gen *PHO1*, que codifica una proteína implicada en el transporte de Pi al xilema, reprimiendo la transcripción de este último durante la suficiencia de Pi (Chen y col., 2009).

### 3.1.3.4 Familia dedo de Zn

La familia dedo de Zn está formada por proteínas que poseen al menos un dominio dedo de Zn. Esta familia se divide a su vez en subfamilias en función del orden y el número de residuos de cisteína e histidina que se unen al ión Zn. Una de las subfamilias más numerosas es C2H2, cuyos miembros están implicados en procesos como la defensa y la aclimatación de las plantas a los estreses medioambientales (Ciftci-Yilmaz y Mittler, 2008). *ZAT6* codifica una proteína de dicha subfamilia cuya transcripción se induce durante el ayuno de Pi y se reprime muy rápidamente cuando las plantas perciben el Pi (Devaiah y col., 2007b). Este gen regula de manera positiva la síntesis de antocianinas en la parte aérea de la planta y la actividad fosfatasa de las raíces (Devaiah y col., 2007b). También participa en la modulación de la arquitectura radicular, regulando negativamente el crecimiento de la raíz principal y la longitud de raíces laterales (Devaiah y col., 2007b).

### 3.2 Otros genes reguladores de la respuesta

Aparte de los factores de transcripción citados, se han descrito otras proteínas que parecen actuar como reguladoras o señalizadoras de la respuesta, si bien se desconocen los mecanismos por los que ejercen su función. Entre ellas cabe destacar las proteínas que contienen el dominio SPX, denominado así por estar presente en las proteínas *SYG1*, *PHO81* y *XPR1*. En *Arabidopsis* se han descrito 20 proteínas que contienen dicho dominio y se han agrupado en cuatro subfamilias. Una de ellas está representada por *PHO1*, que se ha postulado como transportador de Pi en el xilema de la raíz. Sin embargo, no se ha demostrado su capacidad para transportar Pi (Hamburger y col., 2002), por lo que su función podría ser señalizadora, probablemente, a través del dominio SPX. En este sentido se ha descrito recientemente la participación de otra subfamilia de proteínas SPX en la respuesta al ayuno de Pi (Duan y col., 2008) compuesta por 4 proteínas de unos 300 aminoácidos. Además, en estudios realizados en nuestro laboratorio, hemos observado que la función de los dos de estas proteínas, *SPX1* y *SPX2*, es la de reprimir las respuestas al ayuno de Pi en situaciones no carenciales del macronutriente (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultados sin publicar). Por una parte, la sobreexpresión de *SPX1* tiene como resultado una disminución de aproximadamente un 50% del fosfato intracelular libre y una menor acumulación de antocianinas durante el estrés por carencia de Pi. Por otra parte, las plantas portadoras de la doble mutación *spx1, spx2* se caracterizan por tener el doble de fosfato intracelular libre que el genotipo silvestre y acumular más antocianinas durante el estrés. Estos resultados nos han llevado a proponer que *SPX1* y *SPX2* actúan como reguladores negativos de las respuestas al ayuno de Pi, probablemente mediante la inhibición de la unión al DNA del factor de transcripción *PHR1* (M.I. Puga y J. Paz-Ares., resultados sin publicar).

### 3.3 Regulación post-transcripcional

El control de la respuesta frente a cualquier estrés es muy complejo, ya que además de implicar regulación transcripcional, también existen mecanismos de regulación post-transcripcional tales como sumoilación, ubiquitinación, microRNAs y genes no codificantes de proteína.

#### 3.3.1 Sumoilación y ubiquitinación

Si bien aún no se ha identificado en plantas ningún mecanismo clásico de regulación post-traducciona l como la fosforilación/desfosforilación de proteínas



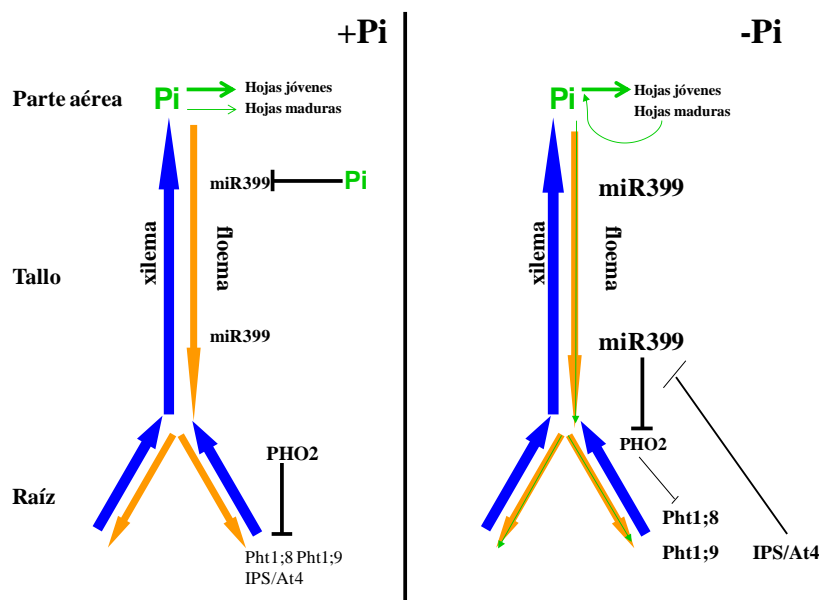
reguladoras durante el ayuno de Pi, se ha descrito que la proteína SIZ1 (enzima E3 ligasa de SUMO) tiene un papel en algunas respuestas durante este estrés (Miura y col., 2005). SIZ1 actúa como vehículo para la sumoilación, que consiste en la incorporación de un pequeño péptido denominado SUMO, que de manera funcional influye tanto de forma positiva como negativa sobre la actividad génica (Watts, 2004). La proteína SIZ1 es capaz de sumoilar a PHR1 *in vitro*, aunque se desconoce el significado de esta modificación (Miura y col., 2005).

En los últimos años se han obtenido evidencias de la participación del proteosoma en la regulación de la homeostasis de Pi en la planta. En condiciones normales de crecimiento, la absorción de Pi del suelo está restringida para evitar el efecto tóxico de su acumulación en exceso, mientras que en condiciones limitantes se estimula su captación. La proteína PHO2 (Delhaize y col., 1995; Aung y col., 2006; Bari y col., 2006) previene el exceso de absorción de Pi en condiciones suficientes de nutrientes. Esta proteína posee características estructurales de enzima E2 conjugasa de ubiquitina implicada en la ruta de ubiquitinación de proteínas, por lo que se ha postulado que su función sería regular la degradación de algún efector positivo de la absorción y transporte de Pi, desconocido hasta la fecha (Aung y col., 2006; Chiou y col., 2006; Bari y col., 2006).

### 3.3.2 microRNAs y genes no codificantes de proteínas

Los microRNAs (miRs) son RNAs de 21-23 nucleótidos que reconocen específicamente por complementariedad de bases a determinados mensajeros e inhiben su traducción y/o los guían hacia su degradación, inhibiendo por tanto su función (Bartel, 2004 y 2009). En los últimos años se ha descrito la participación de diversos miRs en la adaptación de las plantas a las carencias nutricionales (Hsieh y col., 2009; Pant y col., 2009). En particular, el miR395 y el miR399 se inducen de manera específica durante la carencia de Pi y de azufre (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Fujii y col., 2005). Los miR de la familia 399 reconocen específicamente el mensajero de *PHO2*, dirigiendo su degradación y produciéndose un incremento en la absorción de Pi en estas condiciones (Aung y col., 2006; Chiou y col., 2006; Franco-Zorrilla y col., 2007). Además, durante el estrés por carencia de Pi, se induce la transcripción de *IPS1* y *AT4* (genes no codificantes de proteína), que tienen una complementariedad imperfecta con el miR399 por lo que se produce el secuestro del miR399 por *IPS1*, permitiéndose la traducción del mensajero de *PHO2* (Franco-Zorrilla y col., 2007). En base al

conocimiento existente, se ha propuesto el siguiente modelo de regulación mediada por *IPS1*/miR399/*PHO2* en el contexto de las respuestas elaboradas por toda la planta en relación al estatus de Pi del medio. Cuando la planta crece en condiciones de suficiencia de Pi, *PHO2* posee una alta actividad que implica la disminución de la transcripción de los transportadores *Pht1;8* y *Pht1;9* en la raíz. Cuando la planta percibe la carencia de Pi, se incrementa la transcripción del miR399 en las hojas. El miR399 maduro es transportado a la raíz vía floema donde se une al mensajero de *PHO2* dirigiendo el corte del transcrito (Aung y col., 2006; Bari y col., 2006; Franco-Zorilla y col., 2007; Pant y col., 2008; Lin y col. 2008; Doerner, 2008). La disminución de los niveles de *PHO2* conlleva la inducción de la transcripción de los transportadores *Pht1;8* y *Pht1;9*, que facilitan la absorción de Pi en las raíces y su posterior transporte hacia la parte aérea. Por otro lado, se produce la movilización del Pi de las hojas maduras a las hojas jóvenes e incluso a la raíz para mantener la actividad meristemática. Si la situación de ayuno perdura, se produce un incremento en la transcripción de *IPS1*, que secuestra al miR399 y permite la traducción del mensajero de *PHO2*. Este mecanismo de regulación permite el ajuste de los niveles de traducción de *PHO2* de manera rápida y eficiente en función de la demanda de Pi de la planta (Figura 6) (Doerner, 2008).



**Figura 6** Esquema del mantenimiento de la homeostasis de Pi en la planta mediada por el complejo *IPS1*/miRNA399/*PHO2*. Adaptado de Doerner, 2008.

### 3.3.2 Control del tráfico intracelular de los transportadores de Pi

Durante la respuesta al ayuno de Pi, *PHR1* activa la transcripción de los genes que codifican transportadores de Pi de alta afinidad (Rubio y col., 2001). Estos transportadores son sintetizados en el retículo endoplasmático pero ejercen su función en la membrana plasmática. Por ello, deben existir mecanismos que aseguren la correcta localización y ensamblaje de estas proteínas en la membrana. En este sentido se ha descrito que la proteína PHF1 facilita la salida de los transportadores de Pi del retículo endoplasmático y su tráfico hacia la membrana plasmática (González y col., 2005). El concurso de PHF1 es específico del ayuno de Pi, ya que no afecta a otros transportadores de membrana. Además, *PHF1* se induce durante la carencia de Pi, lo que indica un papel clave en relación a la distribución de los transportadores de Pi.

### 3.4 Señales hormonales

Existen evidencias de la participación de casi todas las hormonas en el control de la respuesta de la planta frente a la carencia de Pi (Rubio y col., 2008). En relación al ácido abscísico (ABA) se ha observado una reducción en la acumulación de antocianinas en los mutantes *abi2-1* (insensible a ABA) y *aba1* (deficiente en la síntesis) en condiciones limitantes de Pi. Además, estos mutantes tienen alteradas otras respuestas típicas del ayuno, tales como el aumento de la actividad fosfatasa o cambios en la proporción raíz-parte aérea (Trull y col., 1997). Por otra parte, la adición de ABA a un medio sin Pi, reprime la inducción de la expresión de los genes de la familia *IPS1*, que se inducen durante el estrés (Shin y col., 2006). Estos datos indican que el ABA regula alguna rama de la respuesta frente al estrés de Pi (Rubio y col., 2008).

El etileno regula la proliferación de raíces laterales, la elongación de la raíz principal y determina el crecimiento celular durante la diferenciación de los pelos radiculares. La aplicación de esta hormona provoca una disminución del crecimiento de la raíz principal en condiciones de disponibilidad de Pi, mientras que cuando existe privación del mismo, el efecto es el contrario (Ma y col., 2003). Además, la inhibición de la síntesis del etileno provoca que la iniciación de pelos radiculares tenga lugar más cerca del meristemo de la raíz en plantas sometidas al estrés, mientras que éstos se desarrollan a una distancia mayor en plantas cultivadas en medio rico (Ma y col., 2003). Por todo lo expuesto, se postula que el etileno actúa a distintos niveles regulando la arquitectura radicular dependiente de la concentración de Pi en el medio (Ma y col., 2003).

Las auxinas juegan un papel en la regulación de los cambios que se producen durante el estrés en la arquitectura radicular (López-Bucio y col., 2002). En condiciones limitantes de Pi, las raíces son más sensibles a las auxinas exógenas en relación a la formación de raíces laterales, aunque la inhibición de la longitud de la raíz principal que se produce durante el ayuno es independiente del transporte polar de auxinas (López-Bucio y col., 2002 y 2005; Pérez-Torres y col., 2008). Por tanto, parece que las auxinas no están implicadas en la inhibición del crecimiento de la raíz principal ni en la elongación de las raíces laterales durante el ayuno de Pi, pero su concurso es esencial para la formación y emergencia de las raíces laterales en respuesta a dicho estrés.

Cuando las plantas crecen en concentraciones bajas de Pi se produce una disminución en los niveles de giberelinas (GAs), que se correlaciona con un incremento en la acumulación de la proteína RGA, un miembro de la familia DELLA (Jiang y col., 2007). El sistema GAs-DELLA controla la acumulación de antocianinas y crecimiento de los pelos radiculares características de las plantas sometidas al estrés; sin embargo su acumulación no afecta a la captación y movilización del Pi o a la expresión de genes que se inducen durante la carencia de Pi (Jiang y col., 2007). Todos estos datos indican la contribución de las giberelinas es sólo parcial y por lo tanto, se requieren otras señales para que se desarrolle de manera correcta al ayuno de Pi (Rubio y col., 2008). La sobreexpresión del gen *MYB62* conlleva la disminución en los niveles de transcripción de algunas enzimas de la ruta de biosíntesis de las giberelinas, así como de algunos genes que se inducen frente a la carencia de Pi (Devaiah y col., 2009). Estos hechos ponen de manifiesto de nuevo la participación de las GAs en las respuestas frente a la carencia de Pi (Devaiah y col., 2009).

El grupo de hormonas que más ampliamente se ha estudiado en relación con la carencia de Pi son las citoquininas. La concentración de esta hormona se reduce en plantas sometidas al estrés de Pi, lo que contribuye al incremento en la relación raíz-parte aérea y la proliferación de raíces laterales en estas condiciones (Horgan y Wareing, 1980; Salama y Wareing, 1979; Wagner y Beck, 1993). La adición exógena de citoquininas provoca la represión en raíces de ciertos genes inducibles por la carencia de Pi (Martín y col., 2000). Este efecto represor depende de la ruta canónica de señalización de citoquininas, ya que plantas portadoras de mutaciones en dos de los receptores de citoquininas son incapaces de elaborar las respuestas típicas que producen estas hormonas (Franco-Zorrilla y col., 2002 y 2005).

En resumen, se ha observado una participación más o menos directa de numerosas fitohormonas en la regulación de las respuestas de las plantas al ayuno de Pi. Esto sugiere la existencia de una compleja red de interacciones hormonales y moleculares, destinada a la elaboración de una respuesta coordinada de la planta frente al estrés nutricional.



## **OBJETIVOS**





El objetivo general de este trabajo es contribuir a la caracterización del sistema regulador de la respuesta de las plantas a la disminución de la concentración de Pi del medio mediante la búsqueda de nuevas proteínas implicadas en este sistema. Para ello, se ha realizado una búsqueda de proteínas que interaccionan físicamente con la proteína SPX1, un importante regulador negativo de la respuesta. En relación a este objetivo genérico, se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación de proteínas que interaccionan con la proteína SPX1.
2. Caracterización fisiológica y molecular del gen *bHLH149*.
3. Estudio del papel del gen *bHLH149* durante el ayuno de Pi.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1 Estirpes microbiológicas

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Woodcock y col., 1989), *E. coli* BL21pLysS (Novagen), *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Yanofsky y Nester, 1986) y GV3101 (pMP90) (Koncz y Schell, 1986) y *Saccharomyces cerevisiae* Y187 (Harper y col., 1993) y AH109 (James y col., 1996)

### 1.2 Plásmidos

Plásmidos con origen de replicación de *E. coli*: pDONOR201 (Invitrogen) y pALEX-b (Biomedal). Plásmidos binarios: pBHA (Parcy F., comunicación personal), AGRIKOLA (Hilson y col., 2004), pGWB3 y pGWB6 (Nakagawa y col., 2007). Plásmidos para levaduras pGADT7 y pGBKT7 (Clontech).

### 1.3 Material vegetal

*Arabidopsis thaliana* L. Heynh, ecotipo Columbia y *Nicotiana benthamiana*. Plantas transgénicas *IPS1::GUS* (Martín y col., 2000), mutante *pho2* (Delhaize y Randall, 1995), *35S::SPX1-GFP* y doble mutante *spx1, spx2* generado por cruzamiento a partir de las líneas SALK\_09230 y SALK\_080503 (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultados sin publicar).

## 2. TIPOS DE CULTIVOS

### 2.1 Cultivo de microorganismos

Para el crecimiento de estirpes bacterianas se utilizó el medio de cultivo LB, tanto líquido como sólido (Sambrook y col., 1989), con los requerimientos correspondientes según el caso. La temperatura de crecimiento fue de 37°C para *E. coli* y 28°C para *A. tumefaciens*. El crecimiento en medio líquido se realizó a 250 rpm y la medida del crecimiento a una DO<sub>600</sub>.

Para el cultivo de levaduras se utilizaron los medios de cultivo YPD, YPAD (Sambrook y col., 1989) y YSD (Clontech) tanto en sólido como en líquido con los requerimientos nutricionales necesarios en cada caso. La temperatura de crecimiento fue

de 30°C. El crecimiento en medio líquido se realizó a 250 rpm y la medida del crecimiento a una DO<sub>600</sub>.

## **2.2 Cultivo de plantas**

### **2.2.1 Cultivo in vitro de Arabidopsis**

Para cultivar plantas *in vitro* en medio sólido, se utilizó el medio de cultivo descrito por Johnson (1957) con las modificaciones realizadas posteriormente por Bates y Lynch (1996). Cuando no se especifica la concentración de Pi, se considera que un medio completo (+Pi) tiene una concentración de 1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y un medio pobre (-Pi) contiene solo trazas (1-3 µM). La concentración de sacarosa utilizada fue de 1% p/v en todos los casos y la concentración de agar usada fue 0,7% p/v para las placas horizontales y 1% p/v para las placas verticales. Para la obtención de callos se realizaron explantes de raíces de plantas cultivadas durante 10-12 días en medio +Pi y posteriormente se colocaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa (1% p/v), kinetina y ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a las concentraciones indicadas.

Con el fin de estudiar la sensibilidad a citoquininas, se añadió kinetina y BAP (N<sup>6</sup>-Benziladenina) al medio de cultivo a las concentraciones requeridas para cada caso. En el caso de las giberelinas, se añadió ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) al medio de cultivo a una concentración final de 30 µM. Para los tratamientos con brasinoesteroides y auxinas, se cultivaron las plantas durante 8 días en medio con Pi y sin Pi y se incubaron en medio líquido durante 3 horas con epibrasinólido a una concentración final de 3 µM, y durante 3 y 6 horas con 2, 4-D a una concentración final de 10 µM. En el caso del ácido jasmónico se bañaron las placas con una solución del medio de cultivo con ácido jasmónico a una concentración final de 50 µM y se recogieron las muestras a 1, 3 y 6 horas de tratamiento.

Todas las siembras se realizaron tras esterilizar las semillas con una solución de hipoclorito de sodio (18,75 g/L) y Tween-20 (0,01%) un máximo de 8 min. Posteriormente, las semillas se estratificaron 2-3 días y a continuación se cultivaron a 22°C, con un 60% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas con luz fluorescente de intensidad 100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> durante el tiempo especificado según los casos.

### 2.2.2 Cultivo en tierra de *Arabidopsis*

La siembra se realizó directamente en sustrato universal:vermiculita (3:1). Tras la estratificación (2-3 días), las plantas crecieron en el invernadero o en cámaras climáticas a una temperatura de 22°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

### 2.2.3 Cruzamiento de *Arabidopsis*

Las plantas de *Arabidopsis* se cruzaron emasculando las flores antes de que maduraran las anteras en el receptor, y frotando su estigma con uno o varios estambres maduros del polinizador. Los frutos resultantes se recogieron individualmente y en su descendencia se analizó la segregación.

## 3. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN

### 3.1 Transformación de microorganismos

La transformación de células competentes de *E. coli* con DNA plasmídico se realizó mediante choque térmico (Sambrook y col., 1989). La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* con DNA plasmídico se realizó según An y col. (1988). Las células competentes y transformación de *S. cerevisiae* con DNA plasmídico se realizó según Gietz y col. (2002).

### 3.2 Transformación de *Arabidopsis*

La transformación de *Arabidopsis* se realizó a través de las inflorescencias de plantas cultivadas en tierra durante 3 semanas en el momento en el que presentaban el mayor número posible de meristemos apicales. Se utilizó el método de infiltración por vacío con una suspensión de *A. tumefaciens* portadora de la construcción de interés en medio 0,5X MS suplementado con sacarosa (5%), BAP (11 ng/mL) y agente surfactante Silwet L-77 (0,02%) (Clough y Bent, 1998). La selección de plantas transgénicas se llevó a cabo en medio 0.5X MS al cual se añadió el antibiótico correspondiente en cada caso.

## 4. TECNOLOGÍA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 4.1 Aislamiento, purificación y análisis de DNA

El aislamiento y purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se realizó según *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). El DNA plasmídico de bacterias se extrajo mediante lisis alcalina, utilizando *Qiaprep Spin Miniprep Kit* y *HiSpeed Plasmid MidiKit* para mini y midipreparaciones respectivamente (Qiagen). El DNA plasmídico de levaduras se extrajo según Hoffman y Winston (1987). El DNA genómico de plantas se extrajo por el método descrito por Doyle y Doyle (1990). En todos los casos el DNA se cuantificó tanto en gel de agarosa como por espectrofotometría.

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó mediante PCR (Sambrook y col., 1989). Para ello se utilizaron las polimerasas termoestables Taq y Pwo (Roche) siguiendo las especificaciones del fabricante, y usando los oligonucleótidos necesarios en cada caso.

Para la separación de fragmentos de DNA se utilizaron geles horizontales de agarosa (0,8-2,5%) con EtBr (0,4 µg/mL) en tampón TAE (Tris-acetato 50 mM, EDTA 1 mM) y se resolvieron a 80-100 V.

### 4.2 Aislamiento, purificación y análisis de RNA

Los RNAs fueron extraídos mediante el método *TRI Reagent* (Ambion) suplementado con *Plant RNA Isolation Aid* (Ambion) según instrucciones del fabricante. Los geles para los ensayos tipo *northern* se realizaron según Sambrook y col. (1989). Como tampón de electroforesis se utilizó MOPS 1X. La mezcla de carga consistió en MOPS 1X, formamida (50%), formaldehído (5,9%), azul de bromofenol (0,4 mg/mL) y EtBr (0,4 µg/mL). Posteriormente, el RNA se transfirió a filtros de nylon mediante capilaridad. En cada caso se cargaron entre 18-20 µg de RNA por muestra.

Los fragmentos de DNA que se emplearon como sondas se marcaron radiactivamente con 30 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, utilizando el kit *RediprimeII Random Primed DNA Labelling* (Amersham). Posteriormente, las sondas se purificaron en columnas *MicroSpin S-200 HR* (Amersham). La hibridación se realizó según Church y Gilbert (1984) a 65°C en todos los casos. Los lavados tras la hibridación se realizaron a 65°C con las soluciones 2X SSC-1% SDS; 1X SSC-1% SDS y 0,5X SSC-1% SDS. La



deshibridación de los filtros se hizo en una solución de SDS al 0,5% hirviendo hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Las sondas utilizadas fueron: *At4*, *IPS1*, *ACP5*, *PHT1;1*, *SQD1* (Muchhal y col., 1996; Essigmann y col., 1998; Burleigh y Harrison, 1999; del Pozo y col. 1999; Martín y col., 2000) y *PHF*, *CaBP22* y *SPX1* (Franco-Zorrilla y col. 2005; Duan y col. 2008). La sonda utilizada para la detección del gen *bHLH149* (At1g09250) se obtuvo por PCR a partir del cDNA utilizando los oligos 5'-ATGGTGGAGTCTCTGTTCCCG-3' y 5'-CGTTAAGTTCCGGTCAACGTC-3'. Esta sonda se utilizó en todos los experimentos de *northern* excepto para la detección del gen en aquellas líneas que portaban la construcción de interferencia, en las que se utilizó un fragmento correspondiente desde la posición +242 de dicho gen hasta la posición +624. Este fragmento se obtuvo por PCR utilizando como molde el cDNA y como oligos 5'-TCCGGCGCGGCGA GGGAGATAC-3' y 5'-GTAACCTAATCCGATTCGTC-3'.

## 5. CLONACIÓN

### 5.1 Clonajes para levaduras

Para realizar el ensayo de doble híbrido se clonó el gen *SPX1* (At5g20150) en los vectores pGBKT7 y pGADT7. Para ello, el cDNA correspondiente a *SPX1* se empleó como molde para la amplificación por PCR con los oligos 5'-CCCAGAATTC AAAAGAGCTATGAAGTTTG-3' y 5'-GTCGGATCCTCTATTTGGCTTCTTG-3'. Las deleciones de este gen en los vectores pGBKT7 y pGADT7 se generaron a partir del cDNA mediante PCR con las combinaciones de los oligos siguientes: para la deleción 1 5'-CCCAGAATTCAAAAGAGCTATGAAGTTTG-3' y 5'-TAGGGATCC AAGGTTGCTAAAGAACTTTC-3'; para la deleción 2 5'-CCCAGAATTCAAAAGA GCTATGAAGTTTG-3' y 5'-TCAGGATCCGCTAGGCAGCGATTGTG-3'; para la deleción 3 5'-CAACGAAATTCATGATCAGACTAAAGG-3' y 5'-GTCGGATCCTCT ATTTGGCTTCTTG-3' y para la deleción 4. 5'-CTGGTGAATTCATGCGTTTACCT-3' y 5'-GTCGGATCCTCTATTTGGCTT CTTG-3'. Todos los fragmentos generados se introdujeron en ambos vectores digeridos con BamHI y EcoRI. En los oligos se ha resaltado la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción correspondiente.

El gen *PHO2* (At2g33770) se clonó en los vectores pGBKT7 y pGADT7 amplificando mediante PCR a partir del cDNA utilizando los oligos 5'-TAT

GGAAATGTCCCTTACTGACTCTG-3' y 5'-TTATGATTCTGGTCCAATCTCTTG  
G-3' previamente fosforilados y se introdujo en ambos vectores cortados con SmaI.

La construcción pGADT7- $\Delta$ PHR1 se generó mediante PCR utilizando el cDNA de *PHR1* como molde y los oligos 5'-CCTTCTCCGCATATGGAAATGCGACCTGTTAGCAC-3' y 5'-TCTCTATCACTGGATCCTCTGAAACTCCGAGATTATCCAGC-3'. El fragmento obtenido se introdujo en el vector pGBKT7 previamente digerido con NdeI y BamHI (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultado sin publicar)

## 5.2 Clonajes en el vector de entrada

El cDNA de *bHLH149* (624 pb) se obtuvo a partir del clon aislado en el ensayo de los dos híbridos (ver Apdo. 6). A partir de este clon, se amplificó dicho fragmento mediante PCR utilizando los oligos 5'-attB1-TAATGGTGGAGTCTCTGTTCCCGAGCATCGAAAACACAGGTG-3' y 5'-attB2-GTTAAGTTCCGGTCAACGTCGTCGCG-3' y se clonó mediante tecnología *GATEWAY* (Clontech) en el vector de entrada pDONOR201. Las secuencias attB1 (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3') y attB2 (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3') son los sitios de recombinación del inserto con el vector.

La clonación del promotor del *bHLH149* se realizó amplificando mediante PCR el fragmento comprendido entre las posiciones -2211 y +1 del gen. Para ello, se utilizó como molde DNA genómico y los oligos 5'-attB1-CGTGAAACCGAATCACGTGG-3' y 5'-attB2-TGAATAGATGTAGACATGAG-3'. Posteriormente se introdujo en el vector pDONOR201 mediante tecnología *GATEWAY*.

## 5.3 Clonajes en los vectores binarios

Para la obtención de la construcción *35S::GFP-bHLH149* se utilizó como vector de entrada el pDONOR201 con el cDNA de *bHLH149* y como vector de destino pGWB6. En la fusión transcripcional del promotor del *bHLH149* con la proteína delatora GUS (*pbHLH149::GUS*) se utilizó como donador el plásmido pDONOR201 portador del promotor y como aceptor el vector pGWB3, utilizando en ambos casos la tecnología *GATEWAY*.

Para la realización de la construcción *35S::HA-bHLH149* se amplificó el cDNA de *bHLH149* con los oligos 5'-CGGGATCCAATGGTGGAGTCTCTGTTCCCG-3' y 5'-GTCGGATCCTCTATTTGGCTTCTTG-3'. Posteriormente se introdujo en el vector pBHA previamente digerido con BamHI.

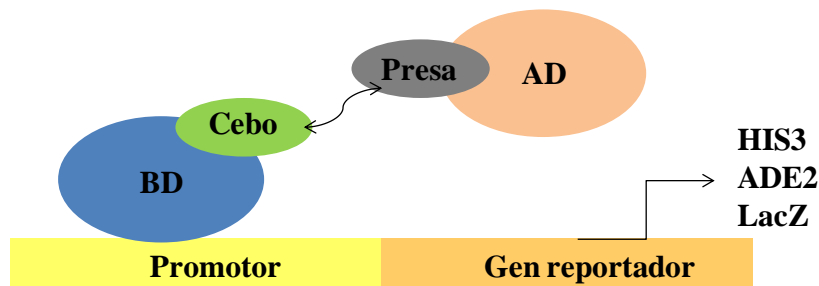
La construcción de interferencia fue cedida por el Consorcio AGRIKOLA (Hilson y col., 2004; [www.agrikola.org](http://www.agrikola.org)).

#### 5.4 Clonaje para la expresión de proteína recombinante en *E. coli*

El clonaje utilizado en la expresión de la proteína se realizó amplificado el cDNA de *bHLH149* con los oligos 5'-CGGGATCCAATGGTGGAGTCTCTGTTC CCG-3' y 5'-GTCGGATCCTCTATTTGGCTTCTTG-3' y se introdujo en el vector pALEX-b (Biomedal) previamente digerido con BamHI.

### 6. DOS HÍBRIDOS POR CONJUGACIÓN EN LEVADURAS

Para realizar la búsqueda de proteínas interactoras con SPX1 se utilizó una genoteca de cDNA generada a partir de RNAs de plantas cultivadas en +Pi y posteriormente transferidas a medio sin Pi durante 12 horas, 1, 2, 4 y 7 días. Posteriormente los cDNAs se clonaron en el vector pGADT7 y se introdujeron en la cepa AH109 (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultados sin publicar). En el ensayo de conjugación de levaduras se inoculó un cultivo de 100 mL de la cepa Y187 portadora de la construcción *pGBKT7-SPX1* en medio YSD sin W y se incubó hasta llegar a una DO<sub>600</sub>: 0,6-0,8. Se centrifugó 10 minutos a 1000 rpm, se resuspendió en 50 mL de 2X YPAD, se añadió una alícuota de la genoteca y se agitó a 90 rpm durante 16 horas a 30°C. Transcurrido ese tiempo, el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm, se resuspendió en 50 mL de solución NaCl (0,09%) y 0,5X YPAD en proporción 1:1,5 y se plaqueó en medio YSD sólido sin W, L, H, A (-WLAH) y con 5 mM de 3-AT (3-amino-1, 2, 4 triazol). Las placas se incubaron a 30°C durante 5 días. La eficiencia de la conjugación fue de  $2,5 \times 10^6$  u.f.c. Los positivos obtenidos se mantuvieron en medio YSD sólido sin los aminoácidos W y L (Clontech). Posteriormente los positivos obtenidos se cultivaron en distintos regímenes auxotróficos (-WLA, -WLH y -WLAH) para discriminar entre las interacciones más fuertes y más débiles (Figura 7).



**Figura 7** Esquema del ensayo de doble híbrido. Cuando interaccionan la proteína cebo y la proteína presa, se produce la unión al DNA y la activación de la transcripción de los genes reportadores HIS3, ADE2 y LacZ.

## 7. TECNOLOGÍA DE PROTEÍNAS

### 7.1 Inducción y purificación de la proteína

Para inducir la expresión de la proteína en *E.coli* se inoculó un cultivo de 200 mL de LB con 1 mL de un preinóculo cultivado durante 12 horas. Se incubó a 37°C hasta una  $DO_{600}$  0,6 y se añadió el ácido salicílico (2 mM) y se incubó a 200 rpm durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se extrajo la fracción soluble con la solución *Bugbuster* (Novagen) según instrucciones del fabricante. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina *LYTRAP* (Biomedal) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez purificada, se analizó mediante gel de acrilamida y posteriormente mediante tinción con solución azul de Coomassie.

### 7.2 Expresión transitoria en *N. benthamiana*

Para la realización de la expresión transitoria en *N.benthamiana* se utilizaron cultivos de 50 mL de *A. tumefaciens* portadores de las construcciones de interés, cultivados durante 16 horas a 28°C. Posteriormente se centrifugaron 20 minutos a 3.000 rpm y se resuspendieron en 10 mL de solución de inducción (10 mM  $Mg_2SO_4$ , 10 mM MES y 150  $\mu$ M acetosiringona) y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Las soluciones celulares se diluyeron hasta una  $DO_{600}$  0,5 en solución de inducción y se inocularon con una jeringa en el envés de 3 hojas jóvenes de plantas cultivadas en el invernadero durante 4 semanas (English y col., 1997). Las hojas se recogieron a los 2 días de la inoculación.

### 7.3 Transcripción y traducción *in vitro*

Para la transcripción y traducción *in vitro* se utilizó el kit *TNT T7 Coupled Wheat Germ Extract System* (Promega) cuando se usó como molde *pGADT7-bHLH149* y *pGBKT7-PHO2* y *TNT T7 Quick for PCR DNA* (Promega) cuando se utilizó como molde un producto de PCR correspondiente al cDNA de *bHLH149*. Para la generación de dicho producto de PCR se utilizaron los siguientes oligos: 5'-GGATCCTAATACG ACTCACTATAGGGAACAGCCACCATGGTGGAGTCTCTGTTCCTCCGAGCATCG-3' y 5'-T<sub>31</sub>AATTTTAAGTTCCGGTCAACGTCGTCCGTGGTGC-3'. En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

### 7.4 Extracción y análisis de proteínas de plantas

Para realizar la extracción de proteínas tanto en *Arabidopsis* como en *N. benthamiana*, el material vegetal se pulverizó y se mezcló con una solución de extracción compuesta por 25 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH7,5, 0,1% Tween-20, 1mM PMSF e inhibidor de proteasas (Roche). Su cuantificación se realizó siguiendo el método Bradford (1976).

Los geles usados para la electroforesis de proteínas se realizaron según Sambrook y col. (1989). El gel concentrador se realizó al 4% de y el separador al 7,5%, al 10% o al 12% según el tamaño de las proteínas analizadas. Ambos geles se hicieron con una mezcla de acrilamida:bisacrilamida (29:1) (Biorad). La mezcla de carga 2X consistió en 63 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS (p/v), 20% glicerol, 125 mM azul de bromofenol y 3 mM 1,4-ditiotreitol. Como tampón de electroforesis se utilizó 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS (Tris-glicina 1X) y se resolvieron a 35 mA el gel concentrador y a 45 mA el gel separador. Una vez realizada la electroforesis se procedió a teñir el gel o a transferir las proteínas a una membrana de PVDF. Para teñir el gel se utilizó una solución compuesta por 0,05% azul de Coomassie, 45% metanol y 7% ácido acético. Posteriormente se trató el gel con solución de desteñir compuesta por 25 % metanol y 7% ácido acético. Para transferir las proteínas se utilizó una membrana de PVDF de 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore). Para ello, se aplicó un voltaje de 55 mA por gel durante 1 hora y 30 minutos, a temperatura ambiente. Como tampón de transferencia se utilizó una solución a pH 8,3 compuesta por 50 mM Tris, 40 mM glicina, 0,040% SDS y 20 % metanol.

La membrana se bloqueó 1 hora a temperatura ambiente en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS con 0,1% Twin-20 (PBS-T). Una vez

bloqueada, se incubó la membrana entre 1 y 3 horas a temperatura ambiente en una solución de leche desnatada en polvo al 1% en PBS-T con el anticuerpo a la titulación indicada por el fabricante. Se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T. En el caso de la utilización de anticuerpos no conjugados a peroxidasa, una vez lavada la membrana, se incubó en una solución de leche desnatada en polvo al 1% en PBS-T con el anticuerpo secundario a la titulación recomendada por el fabricante durante 1 hora y se lavó como se ha indicado anteriormente. Como sistema de detección se usó *ECL Plus Western Blotting Detection System* (Amersham) según indicaciones del fabricante.

Los anticuerpos utilizados fueron: Anti HA conjugado a peroxidasa (Amersham), Anti GFP policlonal (Clontech) y Anti GFP conjugado a peroxidasa (Milteny Biotec).

## **7.5 Inmunoprecipitación**

Las plantas de *Arabidopsis* y las hojas procedentes de la agroinfiltración de *N. benthamiana* se trataron con solución PBS 1X con formaldehído (1%) a 4°C durante 15 minutos al vacío. Se lavaron 2 veces durante 5 minutos con 300mM glicina a 4°C y posteriormente con PBS 1X. Las plantas se secaron, se congelaron y se pulverizaron. Las proteínas se extrajeron con la solución de extracción antes descrita. Para inmunoprecipitar las proteínas fusionadas al epítipo HA, se incubaron 400 µg de proteína total en el caso de las hojas de tabaco y 800 µg en el caso de *Arabidopsis* en un volumen de 500 µL con 20 µL de *Anti-HA Affinity Matrix* (Roche) durante 2 horas en agitación a 4°C. Después se realizaron 3 lavados con 1 mL de solución de extracción y la matriz se eluyó en solución de carga y se hirvió durante 5 minutos. Para inmunoprecipitar las proteínas fusionadas a GFP se incubaron las mismas cantidades de proteína indicadas anteriormente con el anticuerpo policlonal anti-GFP (1:50) a 4°C en agitación durante 1 hora. Posteriormente se añadió 20 µL de proteína A agarosa (Sigma) y se incubó de nuevo a 4°C, en agitación durante 1 hora. Después se realizaron 5 lavados con 1 mL de solución de extracción y la matriz se eluyó en solución de carga y se hirvió durante 5 minutos.

Para inmunoprecipitar la proteína PHO2 se incubó 40 µL del producto de la reacción de transcripción y traducción *in vitro* marcada con 30 µCi de [<sup>35</sup>S]Met con 40 µL de *Anti-MYC Affinity Matrix* (Sigma) durante 1 hora en agitación a 4°C. Posteriormente se añadió 400 µg de proteína total de *Arabidopsis* en un volumen final

de 500  $\mu$ L y se incubó durante 1 hora en agitación a 4°C. A continuación se realizaron 5 lavados con la solución de extracción de las proteínas y la matriz se resuspendió en solución de carga y se hirvió durante 5 minutos.

## 8. ENSAYO DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DEL DNA (EMSA)

Para el gel retardo se utilizó como sonda el oligo degenerado TCGACTCGAGTCGACATCGN<sub>18</sub>GGATCCTGCAGAATTCGCG marcado mediante *Random Primed DNA labeling kit* (Roche) con 30  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Sambrook y col., 1989). Posteriormente se purificó el DNA de cadena doble mediante cromatografía de exclusión molecular con columnas *Illustra MicroSpin G-50 Columns* (GE Healthcare) y a continuación se cuantificó en el contador de centelleo.

La reacción de unión consistió por una parte, en 100 ng de proteína bHLH149 expresada y purificada en *E.coli* y en el caso de la transcripciones y traducciones *in vitro* se añadieron 4  $\mu$ L de reacción total con 11.000 c.p.s de sonda en una solución formada por 10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 mM DTT y 10% glicerol y se incubó durante 30 minutos en hielo (Solano y col., 1995). Posteriormente se cargó en un gel de mezcla acrilamida:bisacrilamida (19:1) al 6% y se resolvió a 170 V a 4°C durante 4 horas. Por último se secó el gel a 55°C durante 2 horas. La banda resultante se cortó y se amplificó mediante PCR utilizando los oligos 5'-TCGACTCGAGTCGACATCG-3' y 5'-CGCGAATTCTGCAGGATCC-3'. El producto obtenido se marcó con la enzima polinucleótido quinasa y 30  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Sambrook y col., 1989). Se cuantificó, se purificó el DNA de doble cadena, se realizó la reacción de unión y gel de retardo como se ha descrito con anterioridad.

## 9. DETERMINACIONES FISILÓGICAS

La tinción GUS se realizó según se describe en Jefferson y col. (1987).

Para determinar el contenido de Pi celular se utilizó el método de Ames (1966), utilizando plantas cultivadas en *in vitro* en las condiciones indicadas en cada caso.

Para la determinación de clorofilas se trituró el material previamente congelado y se extrajeron los pigmentos con acetona (80%). A continuación los extractos se cuantificaron en el espectrofotómetro a  $DO_{645}$  y  $DO_{663}$  (Arnon, 1948).

## 10. ANÁLISIS MICROSCÓPICOS

Las plantas transformadas con la construcción portadora de GFP se analizaron en el microscopio de epifluorescencia Leica DM-R (Leica Microsystem, Wetzlar GmbH, Germany) que cuenta con los filtros de excitación 470/440 nm y los filtros de emisión 525/550 nm.

Para el estudio del número y del tamaño de las células epidérmicas se sumergieron las hojas en ácido láctico (90%) y se incubaron durante 20 minutos a 95°C. Posteriormente se montaron y se observaron al microscopio óptico Axioshop2 Plus (Zeiss).

Las medidas de las raíces y de las superficies foliares se realizaron con la ayuda del programa informático ImageJ.

## 11. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICOS

Para la hibridación de la micromatriz se utilizaron RNAs de las partes aéreas de plantas cultivadas durante 7 días en medio completo y posteriormente transferidas a medio sin Pi durante 4 días. Los RNAs se extrajeron según lo indicado en el Apdo. 4.2 y posteriormente se purificaron por columna *RNeasy mini kit* (QIAGEN) siguiendo instrucciones del fabricante. El RNA se retrotranscribió a cDNA de doble cadena y posteriormente se sometió a transcripción *in vitro* dirigida por un promotor T7, para lo que se empleó *MessageAmp aRNA amplification kit* (Ambion) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para permitir el marcaje posterior con los fluoróforos, se incorporó aminoalil-UTP (Ambion) durante la transcripción *in vitro*. Posteriormente se incubaron 10 µg de aRNA en  $Na_2CO_3$  (1M) con los fluoróforos Cy3 y Cy5 (Amersham) en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió 35 µl de acetato de sodio pH 7,2 (0,1 M) y se incubó durante 5 minutos en oscuridad. El aRNA marcado se purificó con *Megaclear kit* (Ambion) y se cuantificó mediante espectrofotometría. Se hibridaron 3 réplicas biológicas independientes para la



comparación transcriptómica. La micromatriz utilizada fue *Arabidopsis* (V4) *gene expression 4 x 44 K* (Agilent). Para la hibridación se empleó *Gene Expression Hybridization kit* (Agilent) y los lavados se realizaron con *Gene Expression Wash Buffer kit* (Agilent), siguiendo las recomendaciones del fabricante en cada caso. El escaneo realizó con GenePix 400B (Molecular Devices) a una resolución de 5  $\mu\text{m}$  y las imágenes se cuantificaron con *GenePix Pro 5.1* (Axon).

El fondo local se corrigió mediante el método normexp. Las intensidades corregidas de cada réplica se transformaron a escala logarítmica (en base 2) y se normalizaron mediante el método Loess (Smyth y Speed, 2003). Finalmente, con el objeto de obtener intensidades similares para todas las réplicas, los valores normalizados se escalaron mediante el ajuste de sus cuantiles (Bolstad y col., 2003). Una vez procesados los datos, se analizaron estadísticamente los cambios de expresión para cada sonda utilizando el método *Rank Product* (Breitling y col., 2004). Para controlar la tasa de falsos positivos (FDR), los valores P se corrigieron usando el método descrito por Benjamini y Hochberg (1995). Para la visualización y evaluación de los datos obtenidos se utilizó el programa FIESTA (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>).

El procesamiento de las muestras de RNA, hibridación de micromatrices y análisis primario de los resultados se realizó en la Unidad de Genómica del CNB.

## 12. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Para realizar la búsqueda de los genes con el motivo E (CANNTG) en la región proximal de los promotores (-500 pb desde el ATG), se obtuvieron todos los genes de *Arabidopsis* que portaran dicho motivo con la herramienta Patmatch disponible en TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Para los análisis posteriores se consideraron sólo los genes representados en la matriz de *Agilent* (28987 genes). En el caso del experimento de expresión génica en respuesta al ayuno de Pi (Bustos y col., 2010) se consideraron sólo los genes representados en la matriz ATH1 de *Affymetrix* (21011 genes). Asimismo, se valoraron los genes representados en ambas micromatrices en los análisis conjuntos de expresión génica de *bHLH149* y ayuno de pi (20514 genes). Para la determinación del número de motivos de los promotores de los genes seleccionados a

analizar así como el número total de motivos se utilizó el programa *Regulatory Sequence Analysis Tool* (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) de la Universidad Libre de Bruselas (Van Helden, 2003; Thomas-Choullier y col., 2008). La comparación entre estas proporciones de motivos de DNA obtenidos en cada caso se estimó estadísticamente mediante una prueba binomial.

La búsqueda de genes comunes en los dos experimentos transcriptómicos se realizó con el programa VENNY (Oliveros, 2007).

## **RESULTADOS**



## 1. BÚSQUEDA DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA MEDIANTE EL ENSAYO DE LOS DOS HÍBRIDOS EN LEVADURAS

Con el fin de identificar nuevas proteínas reguladoras de las respuestas al ayuno de Pi, se realizó en el laboratorio un escrutinio de proteínas que interaccionaran con PHR1 mediante el sistema de los dos híbridos en levaduras. Para ello se generó una genoteca de expresión en levaduras a partir de RNA de plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en condiciones de ayuno de Pi en periodos comprendidos desde las 12 horas hasta los 7 días. Como resultado de este escrutinio se identificó el producto del gen At5g20150 (*SPX1*, Duan y col., 2008) que interacciona fuertemente con PHR1 (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultados sin publicar).














La proteína SPX1 se caracteriza por poseer el dominio SPX, denominado así por estar presente en las proteínas SYG1, PHO81 y XPR1. El análisis funcional de SPX1 mediante el aislamiento de mutantes de pérdida de función y el análisis de su sobreexpresión indican que esta proteína actúa como regulador negativo de las respuestas al ayuno de Pi (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultados sin publicar). Esta regulación negativa se produce mediante la prevención de la unión de la proteína PHR1 al DNA (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultados sin publicar). Además, esta inhibición ocurre de manera más efectiva cuando se cultivan las plantas en presencia de Pi, por lo que la interacción entre ambas proteínas podría constituir un mecanismo de represión transcripcional en presencia de Pi (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultados sin publicar).

A la vista del papel central de SPX1 en la regulación de la respuesta al ayuno de Pi, se decidió realizar la búsqueda de otros componentes reguladores de la respuesta al ayuno de Pi basada en la capacidad de interacción con dicha proteína. Para ello se llevó a cabo un escrutinio de proteínas que interaccionaran con SPX1 utilizando el sistema de los dos híbridos en levaduras. En primer lugar se fusionó el cDNA de *SPX1* al fragmento que contiene el dominio de unión al DNA del gen *GAL4* de levaduras (BD) y la construcción se cotransformó junto con el vector vacío portador del dominio de activación de la transcripción de *GAL4* (AD) en la cepa Y187, para comprobar si la fusión activaba la transcripción de los genes marcadores (auxotrofías para H y A y actividad  $\beta$ -galactosidasa). Tras determinar que BD-SPX no transactiva *per se* (dato no mostrado), se empleó esta construcción como cebo para escrutar la genoteca de expresión de levaduras. La búsqueda se realizó mediante conjugación y se plaqueó en

medio restrictivo (sin WLAH y con 5 mM de 3-AT) con el objeto de limitar la búsqueda a interacciones fuertes. A los 5 días, se recogieron 380 positivos primarios que se plaquearon en medio sin WL para su mantenimiento. Posteriormente, se cultivaron en medios restrictivos (-WLA, -WLH con 5 y 10 mM de 3-AT y -WLAH con 5 y 10 mM de 3-AT) para discriminar entre las interacciones más fuertes y más débiles. Tras este escrutinio secundario, se seleccionaron 13 clones que mostraron interacción estable y reproducible (Tabla 3). Estos plásmidos se cotransformaron junto con el vector vacío BD (Tabla 3), donde se observó que la proteína correspondiente al gen At2g26460 confería activación con el vector vacío BD. Al mismo tiempo se transformaron en *E. coli* para facilitar su secuenciación. Cabe destacar que en el caso de algunos genes, como At1g03370, At2g43190, At56510, At5g38720 y At5g63550 se obtuvieron varios clones, lo que podría constituir una prueba indirecta de la calidad de las interacciones.

A continuación se buscó la información disponible sobre las proteínas identificadas (TAIR; [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Como se puede observar en la Tabla 4, de las 12 proteínas analizadas, dos de ellas podrían estar implicadas en procesos de degradación de proteínas por el proteosoma (proteínas de los genes At1g03370 y At4g26400), tres de ellas participarían en la regulación de la transcripción (proteínas de los genes At1g09250 y At3g56510), dos en el procesamiento del RNA (proteínas de los genes At2g43190 y At5g38720), una en el desarrollo embrionario (proteína del gen At3g54350) y otra en procesos biosintéticos dependientes de ATP (proteína del gen At1g06190).

**Tabla 2** Resumen de los clones obtenidos en el escrutinio de dos híbridos en levaduras. Con el signo + se simboliza el crecimiento y con el signo – la ausencia de crecimiento en distintos regímenes auxotróficos. Los resultados de autoactivación se obtuvieron al cultivar en medio restrictivo (-WLAH + 5 mM de 3-AT) los cotransformantes portadores de los clones obtenidos en el escrutinio con el vector pGBKT7 vacío en la cepa de levaduras AH109. Con ID se abrevia identificador y con Auto autoactivación.

ID	Nº clones	-WLH 5 mM 3-AT	-WLH 10 mM 3 –AT	-WLAH 5mM 3 –AT	-WLAH 10 mM 3-AT	β-GAL	Auto
At1g03370	2	+	+	+	+		-
At1g09250	1	+	+	+	+		-
At1g58070	1	+	+	+	+		-
At2g43190	3	+	+	+	+		-
At3g54350	1	+	+	+	+		-
At3g56510	2	+	+	+	+		-
At4g26400	1	+	+	+	+		-
At5g38720	7	+	+	+	+		-
At5g63550	2	+	+	+	-		-
At1g15200	1	+	+	+	-		-
At3g07860	1	+	+	+	-		-
At1g06190	1	+	-	+	-		-
At2g26460	1	+	+	+	+		+

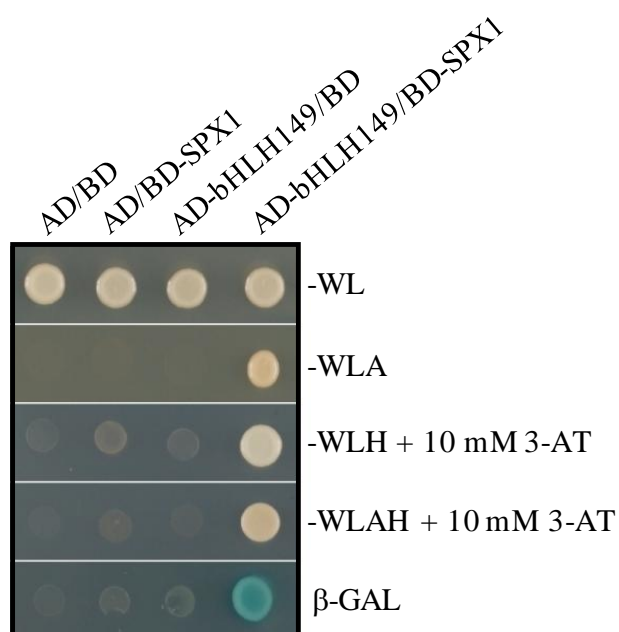
**Tabla 3** Descripción y términos GO (*Gene ontology*) de las proteínas obtenidas mediante la búsqueda de interacciones utilizando el sistema de los dos híbridos. Datos obtenidos de TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)).

ID	DESCRIPCIÓN	PROCESO BIOLÓGICO	FUNCIÓN MOLECULAR	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR
At1g03370	Proteína con dominio C2 y RING finger	Desconocido	E3-ligasa	Desconocida
At1g06190	Proteína de unión a ATP	Procesos biosintéticos dependientes de ATP	Actividad ATPasa Movimiento de iones a través de membranas Mecanismos de fosforilación	Cloroplasto
At1g09250	bHLH149	Regulación de la transcripción	Factor de transcripción	Núcleo
At1g15200	Proteína reguladora de la interacción proteína proteína con dominios Pinin/SDK/memA	Desconocido	Desconocida	Desconocida
At1g58070	Proteína desconocida	Desconocido	Desconocida	Desconocida
At2g43190	Proteína de la familia ribonucleasa P	tRNA Procesamiento de rRNA	Unión a RNA	Complejo ribonucleasa P
At3g54350	EMBRYO DEFECTIVE 1967 con dominio forkhead	Terminación del desarrollo embrionario en la dormición de la semilla	Desconocida	Desconocida
At3g56510	Proteína que se une a la proteína TBP	Desconocido	Unión a la proteína que se une a la caja TATA	Desconocida
At4g26400	RING finger (tipoC3HC4)	Respuesta a quitina	E3-ligasa	Sistema de endomembranas
At5g38720	Proteína desconocida	Desconocido	Procesamiento de RNAr	Desconocida
At5g63550	Proteína desconocida	Desconocido	Desconocida	Desconocida
At3g07860	Proteína desconocida	Desconocido	Desconocida	Desconocida



## 2. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN SPX1-bHLH149 EN LEVADURAS

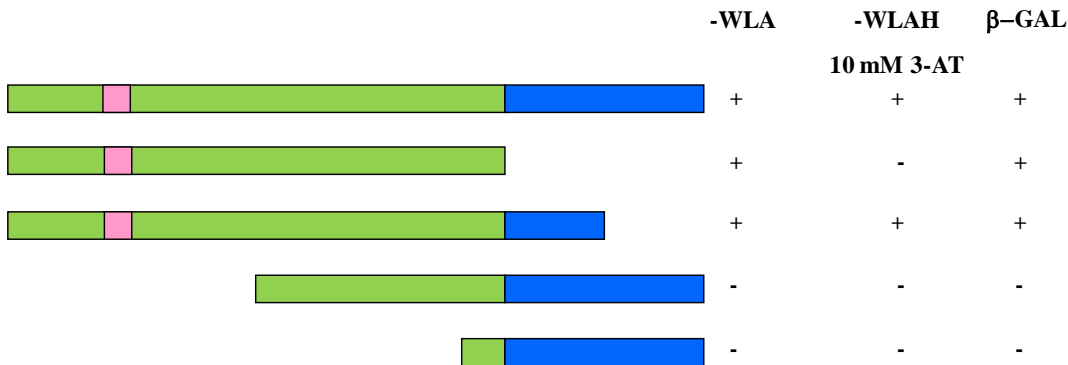
A la vista de los resultados obtenidos se decidió continuar con el estudio más exhaustivo del gen At1g09250 (*bHLH149* de acuerdo con la nomenclatura de Heim y col., 2003) por codificar éste a una proteína nuclear como SPX1, presumiblemente implicada en la regulación de la transcripción y que posee un dominio básico hélice-giro-hélice (bHLH). La interacción entre ambas proteínas resultó bastante fuerte ya que el híbrido creció en medio muy restrictivo (-WLAH + 10 mM 3-AT) y además mostró actividad  $\beta$ -galactosidasa (Figura 8)



**Figura 8** Crecimiento en distintos regímenes auxotróficos de los cotransformantes y ensayo cualitativo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -GAL). Con AD y BD se representan los vectores vacíos.

Con el fin de determinar la región de SPX1 necesaria para la interacción con la proteína bHLH149, se realizaron cotransformaciones de *bHLH149* fusionado al AD junto con distintas delecciones de SPX1 fusionadas al BD. Como delecciones se utilizaron fragmentos correspondientes al dominio SPX exclusivamente (158 aminoácidos), al dominio SPX y parte de la región carboxilo terminal (214 aminoácidos), a la mitad del dominio SPX con la región carboxilo terminal completa (170 aminoácidos) y a los 10 últimos aminoácidos del dominio SPX y la región carboxilo terminal completa (108 aminoácidos) (Figura 9). La proteína bHLH149 mostró interacción en medio selectivo sin WLA con los fragmentos que contenían el dominio SPX completo. Asimismo, en

ensayos de complementación de cuatro auxotrofías y en presencia de 10 mM de 3-AT, la interacción resultó más estable en las construcciones portadoras de parte de la región carboxilo terminal (Figura 9). Además, la delección parcial o total del dominio SPX abolió completamente la interacción con SPX1 (Figura 9). Estos resultados indican que el dominio SPX es necesario y suficiente para la interacción con la proteína bHLH149, si bien la región carboxilo terminal próxima al dominio SPX1 estabiliza dicha interacción.



**Figura 9** Esquema de las delecciones de BD-SPX1 utilizadas para la cotransformación con la fusión AD-bHLH149. En verde se representa el dominio SPX que incluye la SLN (señal de localización nuclear; caja rosa), y en azul la región carboxilo terminal. A la derecha se representan los resultados obtenidos al plaquear los cotransformantes en medio selectivo (-WLA y -WLAH + 10 mM de 3-AT) y la presencia o ausencia de actividad β-galactosidasa (β-GAL).

### 3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA bHLH149

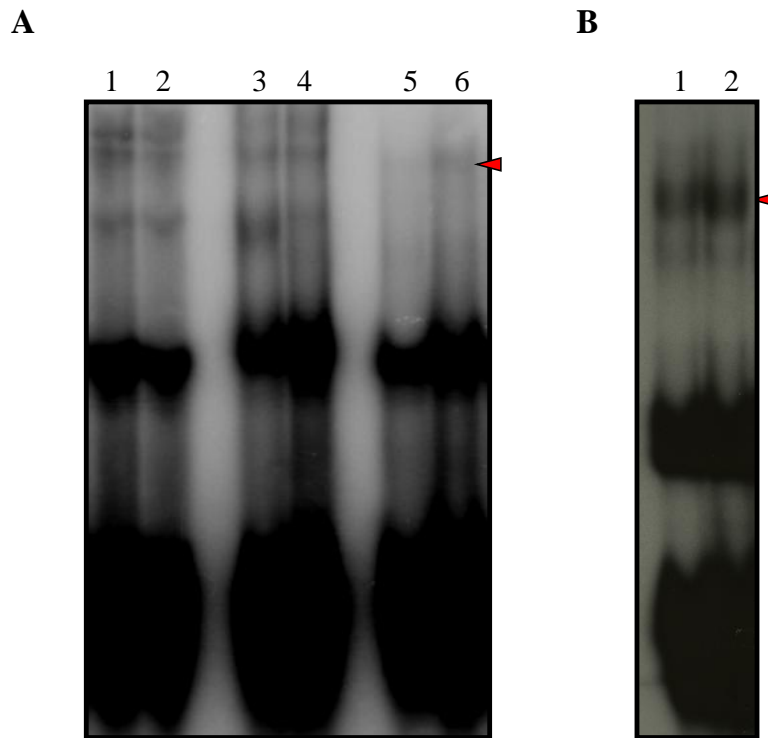
La secuencia codificante de *bHLH149* consta de 624 nt y no posee ningún intrón. Se traduce en una proteína hipotética de 207 aminoácidos y 23,15 kDa de peso molecular. La proteína forma parte de la superfamilia bHLH. Está clasificada como AtbHLH149 (Heim y col., 2003) y más recientemente como AIF4 (ATBS1 INTERACTING FACTOR, Wang y col., 2009). Esta proteína está clasificada dentro del grupo de las proteínas bHLH que se predice que no poseen capacidad de unión a DNA ya la región básica es débil (con pocos aminoácidos básicos), y además carece de los residuos E13/R16 que son críticos para la unión al DNA (Toledo-Ortiz y col., 2003; Tabla 4).

**Tabla 4** Alineamiento aminoácido del dominio bHLH de las proteínas que carecen de la pareja Glu13/Arg16). En verde se resalta la secuencia aminoacídica de la proteína bHLH149. Adaptado de Toledo-Ortiz y col., 2003.

	BÁSICO		HÉLICE		GIRO	HÉLICE	
NºbHLH	10	20	30	40	50	60	
12	MFPSQNSGLN	QDDPSDRRKE	NEKFSVLRTM	VPTV...NEV	DKESILNNTI	KYLQELEARV	E
110	PRVE.SRSSC	PPFKV <b>R</b> KEKL	GDRIAALQQL	VSPF...GKT	DTASVLMEAI	GYIKFLQSQI	E
68	PRIQSPSSQ	STLKV <b>R</b> KEKL	GGRIAALHQL	VSPF...GKT	DTASVLSEAI	GYIRFLQSQI	E
123	RAKSEAASPS	PAFK. <b>R</b> KEKM	GDRIAALQQL	VSPF...GKT	DAASVLSEAI	EYIKFLHQVQ	S
112	KPRVTTPSPL	PTFKV <b>R</b> KENL	RDQITSLQQL	VSPF...GKT	DTASVLQEI	EYIKFLHDQV	T
114	RPRLETLSPL	PSFKV <b>R</b> KEKL	GDRI TALQQL	VSPF...GKT	DTASVLNEAV	EYIKFLQEIV	T
111	AKCSEGSTLS	PEKELPKAKL	RDKITTLQQL	VSPF...GKT	DTASVLQEI	TYINFYQEIV	K
48	HSLAERVHIN	LTDMA <b>R</b> REKI	NARMKLQEL	VPGC...DKIQ	GTALVLDEII	NHVQTLQRQV	E
83	PTTSPKDPQS	LAAKN <b>R</b> RERI	SERLKIQLQEL	VPNG...TK.V	DLVTMLEKAI	SYVKFLQVQV	K
86	ATTSPKDPQS	LAAKN <b>R</b> RERI	SERLKIQLQEL	VPNG...TK.V	DLVTMLEKAI	GYVKFLQVQV	K
54	TKGTATDPQS	LYARK <b>R</b> REKI	NERLKLQNL	VPNG...TK.V	DISTMLEEAV	HYVKFLQLQI	K
85	SRGAATDPQS	LYARK <b>R</b> RERI	NERLKLQNL	VPNG...TK.V	DISTMLEEAV	HYVKFLQLQI	K
139	NRGIASDPQS	LYARK <b>R</b> RERI	NDRLKTLQSL	VPNG...TK.V	DISTMLEDAV	HYVKFLQLQI	K
88	NVRISKDPQS	VAARH <b>R</b> RERI	SERIRILQRL	VPNG...TK.M	DTASMLDEAI	HYVKFLKQV	Q
43	NVRISDDPQS	VAARH <b>R</b> RERI	SERIRILQRL	VPNG...TK.M	DTASMLDEAI	RYVKFLKQV	R
40	NVRISDDPQT	VVAR <b>R</b> RERI	SEKIRILKRI	VPNG...AK.M	DTASMLDEAI	RYTKFLKQV	R
87	NVKISTDPQT	VAAR <b>R</b> RERI	SEKIRILQTL	VPNG...TK.M	DTASMLDEAI	NYLKFLRAQV	K
140	TSTLSTDPQS	VAARD <b>R</b> RRI	SDRFKILQSM	VPNG...AK.M	DTASMLDEAI	SYVKFLKQV	W
142	STKEDTGSGGL	SNEQSSSKDKI	RTALKILESV	VPNG...KGN	EALLLLEDAI	DYKLLKRD	I
144	QSLSGSASSS	NNDGKGRKKM	KKMMGVLRRI	VPNG...EQM	NTACVLDEAV	QYKSLKIEA	Q
117	TSGSPTASND	GGIITKRRKI	SDKIRSLKEL	MPWE...RKMN	LAM.TLEESH	KYIKFLQSQI	A
146	DGIRILERPD	KEGGNEEGGI	EERLRELKKL	LPNG...EEMN	VEE.MLSEIG	NYIKCLELQT	I
149	GNCKSRKGLT	ETNRIKLPAV	ERKLKILGRL	VPNG...RKVS	VPN.LLDEAT	DYIAALEMQV	R
150	LAAAIRGSGG	SGRRRKLSAV	GNRVRLGGL	VPNG...RRTA	LPE.LLDETA	DYIAALEMQV	R
151	IMIRPRKSVE	AASRRPCRAI	HRVKTILKEL	VPNT...KTSE	GLDGLFRQTA	DYTLALEMKV	K
152	LVLKRQWLIG	TTREG <b>R</b> SGSI	QIKMRKLRLV	IPNG...RRLN	QPDLLLTCTA	DYIMHLELRI	R

Para contrastar la hipótesis de que bHLH149 no une a DNA se realizaron ensayos de cambio de la movilidad electroforética del DNA en gel (EMSA). Para ello se expresó la proteína bHLH149 en *E. coli* y se purificó mediante cromatografía de afinidad. Una vez purificada la proteína, se realizaron ensayos de tipo *western* para comprobar su tamaño y con ello la integridad de la proteína purificada (datos no mostrados). Además de la proteína recombinante, se empleó el producto de la transcripción y traducción *in vitro* (TNT) utilizando como molde el plásmido utilizado en los dos híbridos (*pGADT7-bHLH149*) y un producto de PCR correspondiente al cDNA de *bHLH149* fusionado al promotor T7. Como sonda para el EMSA se usó una mezcla de oligonucleótidos que contenía todas las posibles secuencias de 18 nt flanqueadas por dos secuencias adaptadoras que permiten su amplificación posterior por PCR. Tras la incubación de las diferentes proteínas con la sonda marcada radiactivamente, no se apreció ninguna banda diferencial respecto a su correspondiente control, a excepción del carril correspondiente a la proteína recombinante expresada en

*E. coli* (Figura 10A). Esta banda podría corresponder a la unión de la proteína bHLH149 con el DNA. Para examinar esta probabilidad, la banda se amplificó por PCR y se empleó como sonda para un segundo EMSA. En este caso, se observó que el fragmento de DNA amplificado se unía tanto a la proteína expresada en *E. coli* como al control negativo (Figura 10B) por lo que no puede considerarse un efecto específico de la unión a DNA de la proteína bHLH149.



**Figura 10** A) Análisis de la capacidad de unión de bHLH149 a DNA mediante experimentos de cambio de la movilidad electroforética del DNA (EMSA). Los carriles marcados con números se corresponden a las proteínas obtenidas a partir de TNT-pGADT7 (1), TNT-pGADT7-bHLH149 (2), TNT-sin molde (3), TNT con el producto de PCR correspondiente al cDNA del *bHLH149* (4), cLYTAG (5) y cLYTAG-bHLH149 (estas últimas purificadas por cromatografía de afinidad) (6). Como sonda se utilizó una mezcla de oligonucleótidos con secuencias al azar marcados radiactivamente. B) Resultado del segundo EMSA. Los carriles corresponden a las proteínas cLYTAG (1) y cLYTAG-bHLH149 purificadas por cromatografía de afinidad y como sonda se utilizó el producto de PCR resultante de la amplificación de la banda cortada en la primera ronda, marcada de forma radiactiva.

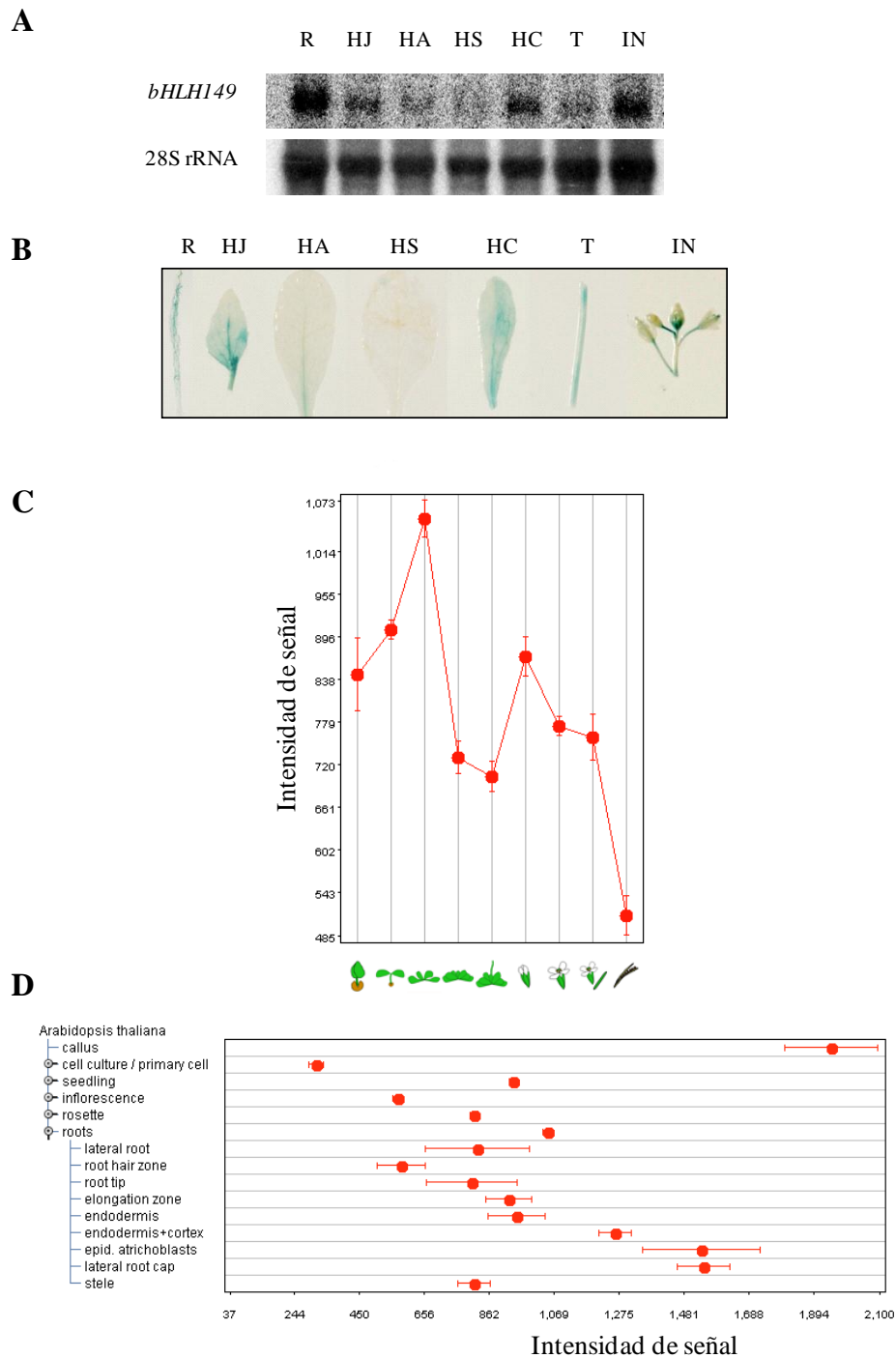
## 4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *bHLH149*

### 4.1 Expresión de *bHLH149* durante el desarrollo

Con el fin de conocer el patrón de expresión del gen *bHLH149* en la planta adulta se realizaron experimentos de tipo *northern*. Para ello se analizaron RNAs procedentes de diferentes órganos de plantas de *Arabidopsis* cultivadas en el invernadero durante 23 días. Así, se detectó acumulación de transcritos de *bHLH149* en raíz, en hoja joven, adulta y caulinar, en tallo y en inflorescencias. Cabe destacar que la expresión de este gen disminuye a medida que las hojas se desarrollan, desapareciendo en hojas senescentes (Figura 11A).

Por otra parte, se obtuvieron plantas transgénicas portadoras de un fragmento promotor de *bHLH149* fusionado al gen delator GUS (*pbHLH149::GUS*), con el fin de determinar con mayor precisión la expresión del gen en estudio. La tinción histoquímica de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) mostró resultados muy similares a los obtenidos mediante *northern* (Figura 11B). Además, se observaron niveles máximos de actividad GUS en la región basal de las hojas jóvenes desapareciendo completamente en hojas senescentes.

En actualidad se dispone de datos de expresión de la mayoría de los genes de *Arabidopsis* gracias a los análisis transcriptómicos con micromatrices de DNA. Esta información está fácilmente accesible a través de varias bases de datos (por ejemplo BAR: [bar.utoronto.ca](http://bar.utoronto.ca), GENEVESTIGATOR: [www.genevestigator.com](http://www.genevestigator.com)). De esta forma se comprobó que *bHLH149* se expresa en todos los estadios de desarrollo de la parte aérea, alcanzado el máximo nivel de expresión en las hojas jóvenes y disminuyendo a medida que la roseta se va desarrollando (Figura 11C). Estos perfiles coinciden con los resultados obtenidos mediante las hibridaciones tipo *northern*. Además, se puede analizar con detalle la expresión génica en los diferentes tipos celulares de la raíz (Brady y col., 2007). Así hemos observado que *bHLH149* se expresa en todos los tipos celulares, teniendo máxima expresión en las células corticales y epidérmicas (Figura 11D).

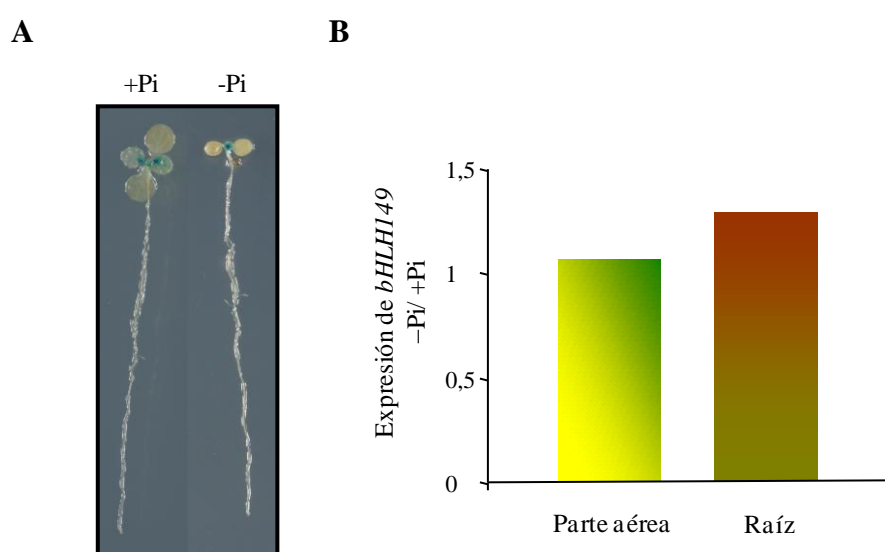


**Figura 11** A) Hibridaciones tipo *northern* correspondientes a la expresión del gen *bHLH149* en distintos órganos de plantas cultivadas en el invernadero durante 23 días. Los órganos analizados fueron raíz (R), hoja joven (HJ), hoja adulta (HA), hoja senescente (HS), hoja caulinar (HC), tallo (T) e inflorescencia (I). B) Ensayo GUS de plantas portadoras de la construcción *pbHLH149::GUS* cultivadas durante 23 días en el invernadero. C) Patrones de expresión del gen *bHLH149* obtenidos mediante la hibridación de micromatrices en distintos estadios de desarrollo de la parte aérea. D) Patrones de expresión obtenidos mediante la hibridación de micromatrices en distintos estadios de desarrollo de la planta así como en diferentes tipos celulares de la raíz. C y D) Datos obtenidos de GENEVESTIGATOR ([www.genevestigator.org](http://www.genevestigator.org)).

#### 4.2. Expresión de *bHLH149* en respuesta al estrés por ayuno de Pi

Con el objeto de conocer los patrones de expresión de *bHLH149* en respuesta a la concentración de Pi del medio, se cultivó la línea *pbHLH149::GUS* en ausencia (-Pi) y en presencia (+Pi) de dicho macronutriente y se analizó la actividad GUS en diferentes momentos del desarrollo (Figura 12A). En ambos regímenes nutricionales de Pi y a ambos tiempos, se observó que la actividad GUS se restringía a las hojas en desarrollo (Figura 12A), observándose mayor tinción histoquímica en la base de las hojas (Figura 12A). No se detectó actividad GUS en los cotiledones en ninguna de las condiciones analizadas. Asimismo, no se observaron diferencias en este patrón de expresión en relación al ayuno de Pi en diferentes momentos del desarrollo (datos no mostrados).

Por otra parte, por medio de experimentos de hibridaciones de micromatrices realizados en nuestro laboratorio con RNAs procedentes de partes aéreas y de raíces cultivadas durante una semana en presencia y en ausencia de Pi, se observó que la expresión de *bHLH149* no varía significativamente en función del régimen nutricional (Figura 12B) (R. Bustos y col., 2010).



**Figura 12** A) Ensayo GUS de plantas *pbHLH149::GUS* cultivadas durante 7 días en medio sin Pi (-Pi) y en medio completo (+Pi). B) Expresión de *bHLH149* en -Pi relativa a +Pi (Bustos y col., 2010).

### 4.3 Regulación hormonal de la expresión de *bHLH149*

Existen evidencias de la participación de diversas hormonas en el control de la respuesta frente a la carencia de Pi en *Arabidopsis*. Con el fin de caracterizar más detalladamente la expresión de *bHLH149* en respuesta a diferentes hormonas se usó la línea *pbHLH149::GUS* que, como se ha indicado anteriormente, refleja fielmente la expresión del gen *bHLH149*. Para ello, se cultivaron plantas de la línea marcadora en medios con distintas hormonas tales como brasinoesteroides (epibrasinólido; Br), ácido jasmónico, auxinas (2,4-D), citoquininas (kinetina y BAP) y giberelinas (ácido giberélico; GA<sub>3</sub>). No se observaron diferencias histoquímicas entre las plantas tratadas y plantas sin tratar en el caso de los brasinoesteroides (Figura 13), ácido jasmónico y auxinas (datos no mostrados).



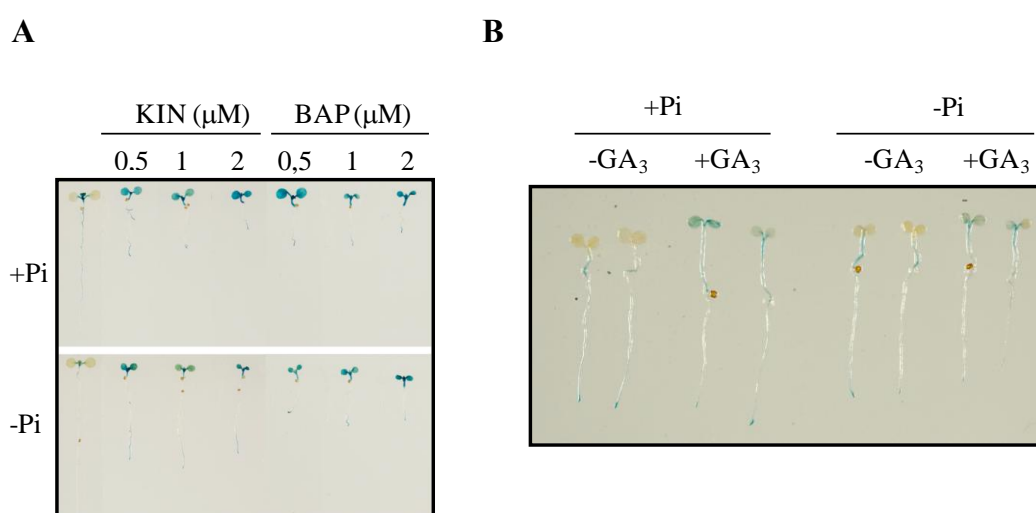
**Figura 13** Ensayo GUS de plantas portadoras de la construcción *pbHLH149::GUS* cultivadas durante 8 días en medio completo (+Pi) y en medio sin Pi (-Pi) e incubadas durante 3 horas con 3  $\mu$ M de epibrasinólido (Br).

Sin embargo, sí se observaron diferencias en la tinción histoquímica en los tratamientos con citoquininas y giberelinas, hormonas implicadas en los procesos de división y elongación celular (Figura 14). Las citoquininas son el grupo de hormonas que más se han estudiado en relación con la carencia de Pi. La concentración de estas hormonas se reduce en plantas sometidas al estrés de Pi (Horgan y Wareing, 1980; Salama y Wareing, 1979; Wagner y Beck, 1993) y su aplicación exógena reprime la expresión de algunos genes de respuesta frente a la carencia de Pi (Martín y col., 2000; Franco-Zorrilla y col., 2002 y 2005). Las plantas tratadas con citoquininas mostraron un



aumento de la actividad GUS en la parte aérea de forma dependiente de la concentración de hormona en el medio, aunque independiente del estatus de Pi (Figura 14A). Estos resultados indican que el gen *bHLH149* se induce en presencia de citoquininas en el medio.

Las giberelinas son hormonas implicadas en procesos tales como germinación, crecimiento de la raíz, crecimiento del hipocotilo, expansión de las hojas e iniciación del desarrollo floral (Hooley, 1994 y Richards y col., 2001). Como se puede observar en la Figura 14B, la aplicación de la hormona incrementó la actividad GUS en los hipocotilos y en los haces vasculares de los cotiledones independientemente de la cantidad de Pi presente en el medio, por lo que concluimos que el gen *bHLH149* se induce en respuesta a giberelinas.

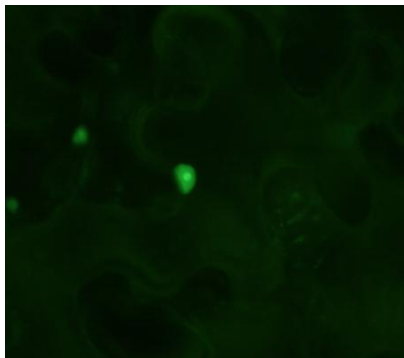


**Figura 14** A) Ensayo GUS de plantas portadoras de la construcción *pbHLH149::GUS* cultivadas durante 7 días en medio completo (+Pi) y en medio sin Pi (-Pi) con diferentes concentraciones de citoquininas (kinetina y BAP). B) Ensayo GUS de plantas portadoras de la construcción *pbHLH149::GUS* cultivadas durante 4 días en medio completo (+Pi) y en medio sin Pi (-Pi) en presencia y ausencia de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

## 5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA GFP-bHLH149

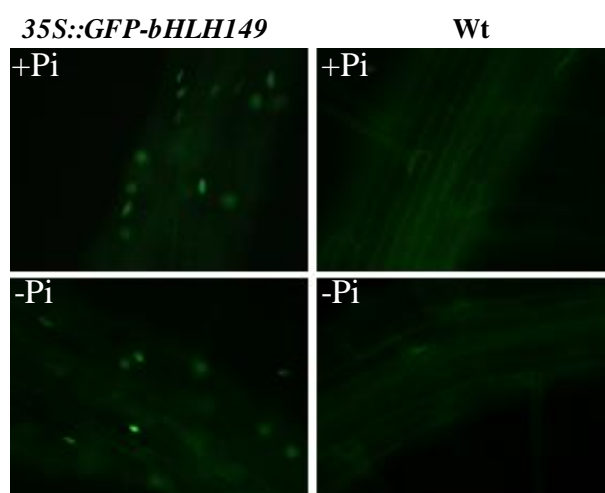
Con la finalidad de conocer la localización subcelular de la proteína bHLH149, se generó una fusión traduccional del gen *GFP* fusionado al extremo 5' de la región codificante de *bHLH149* bajo el control del promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (*35S::GFP-bHLH149*), que confiere expresión constitutiva del gen situado bajo su control. La localización de la proteína resultante se evaluó inicialmente mediante expresión transitoria por agroinfiltración de dicha construcción en hojas de

*Nicotiana benthamiana*. A los dos días de la inoculación, se observaron las hojas agroinfiltradas al microscopio de fluorescencia, revelando una localización nuclear de la proteína (Figura 15).



**Figura 15** Imagen de microscopía de fluorescencia de células de epidermis de *Nicotiana benthamiana* en las que se expresó transitoriamente la fusión 35S::GFP-bHLH149.

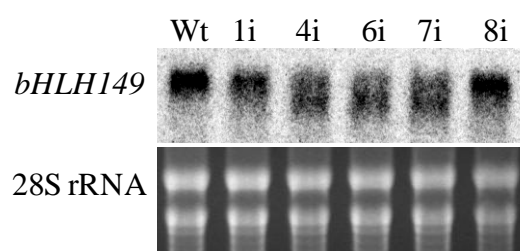
Con el fin de analizar la localización de la proteína bajo diferentes regímenes de Pi, se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis* portadoras de la misma construcción. Las plantas se cultivaron durante 5 días en medio completo y sin Pi y se observaron las raíces en el microscopio de fluorescencia. La localización de la proteína demostró ser nuclear, como ya se había observado en *Nicotiana benthamiana*, y dicha localización no variaba en función del estatus de Pi en el que se hubieran cultivado las plantas (Figura 16).



**Figura 16** Imágenes de microscopía de fluorescencia de raíces de plantas de *Arabidopsis* portadoras de la construcción 35S::GFP-bHLH149 (a la izquierda) cultivadas durante 5 días en medio completo (+Pi) o sin Pi (-Pi). Como control se utilizaron plantas de genotipo silvestre que presentan autofluorescencia en las paredes (a la derecha).

## 6. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *bHLH149*

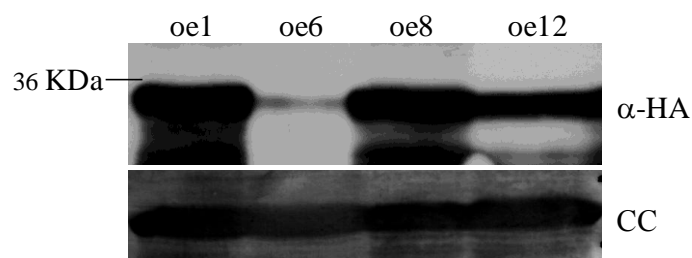
La estrategia más utilizada para abordar el análisis funcional de un gen es generar plantas con actividad incrementada y plantas con actividad reducida del mismo. Para la obtención de las plantas con actividad reducida de *bHLH149*, se buscaron líneas mutantes mediante inserción del T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* en los bancos de germoplasma. Dado que no había líneas mutantes disponibles para este gen, se utilizó la estrategia basada en la expresión de un RNA de interferencia (RNAi), cuya construcción fue facilitada por el consorcio AGRÍKOLA y consiste en un fragmento de 169 pb correspondiente al extremo 5' codificante del cDNA (Hilson y col., 2004), ya que esta región es la más divergente en la familia bHLH (Toledo-Ortíz y col. 2003) y por tanto la más específica para el gen. Se transformaron plantas portadoras de la fusión *pIPS1::GUS* (Martín y col., 2002) con la construcción de interferencia, y una vez obtenidas las líneas homocigotas se analizó la expresión de *bHLH149* mediante hibridaciones tipo *northern*. La expresión del gen endógeno en cuatro de las líneas transgénicas analizadas era menor que en la línea parental *pIPS1::GUS*, a la que en adelante se denominará como genotipo silvestre (Wt) (Figura 17). Se eligieron dos líneas RNAi-*bHLH149* independientes (6i y 7i) para la realización de los estudios posteriores, por presentar niveles menores de expresión del gen *bHLH149* y por tanto representar versiones hipomorfas del mismo.



**Figura 17** Hibridación de tipo *northern* de plantas portadoras de la construcción de interferencia de *bHLH149* en homocigosis cultivadas durante 7 días en medio completo. Como control se utilizaron plantas del genotipo silvestre (Wt).

Con el objeto de obtener líneas que sobreexpresaran *bHLH149* se realizó la fusión traduccional del epítipo HA al extremo amino terminal de *bHLH149* bajo el control del promotor constitutivo 35S (*35S::HA-bHLH149*, ox-*bHLH149*) y, como en el caso anterior, se transformaron plantas *pIPS1::GUS*. Una vez obtenidas las líneas homocigotas, se analizaron mediante ensayos de tipo *western* y se eligieron las líneas

oe1 y oe8 para la realización de estudios posteriores por poseer altos niveles de acumulación de la proteína de fusión (Figura 18).

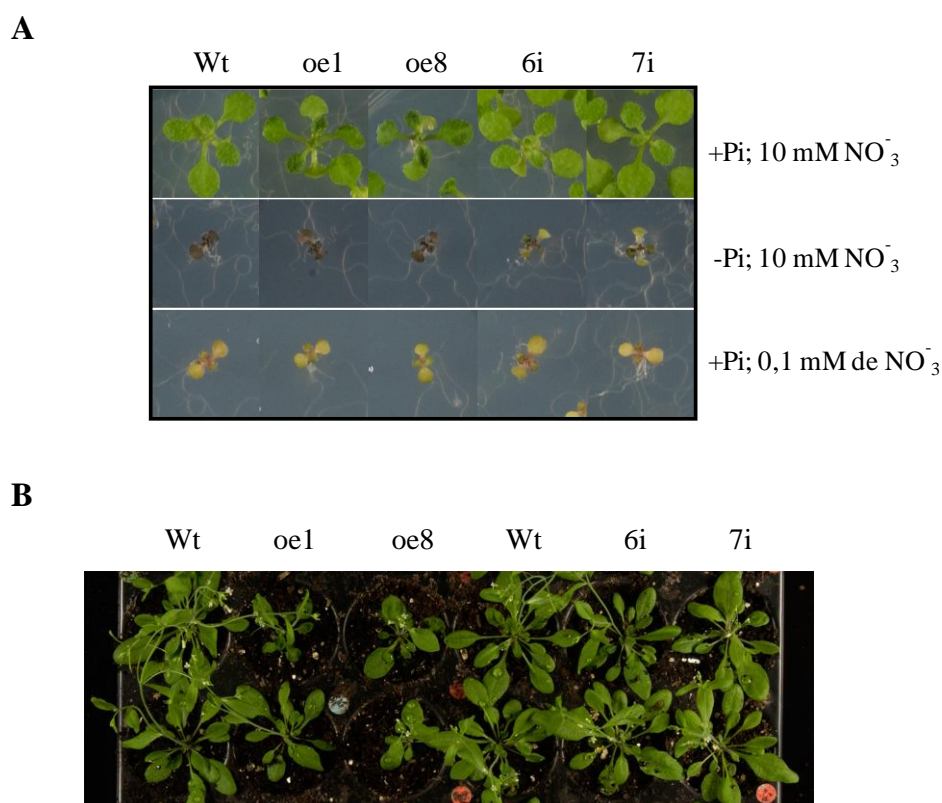


**Figura 18** Ensayos de tipo *western* de varias líneas portadoras de la construcción *35S::HA-bHLH149*. Las plantas se cultivaron durante 7 días en medio completo. La detección inmunológica se realizó con un anticuerpo anti-HA ( $\alpha$ -HA) y como control de carga se tiñó la membrana con solución Rojo Ponceau (CC).

### 6.1. Caracterización fenotípica

En primer lugar se analizó el fenotipo de las líneas ox-bHLH149 y RNAi-bHLH149 respecto a la concentración de Pi del medio. Las hojas jóvenes de las dos líneas ox-bHLH149 poseían el haz de las hojas curvado hacia arriba cuando se cultivaron en medio completo (Figura 19A) y en tierra (Figura 19B). Además las plantas mostraron un leve retraso en el crecimiento de la roseta, hecho que se observó mejor en las plantas de mayor edad (Figura 19B). Sin embargo, cuando se cultivaron las mismas líneas en medio sin Pi, no se observaron diferencias significativas respecto al genotipo silvestre (Figura 19A). Estos resultados ponían de manifiesto la implicación de *bHLH149* en el control del desarrollo de las hojas en función del contenido de Pi del medio.

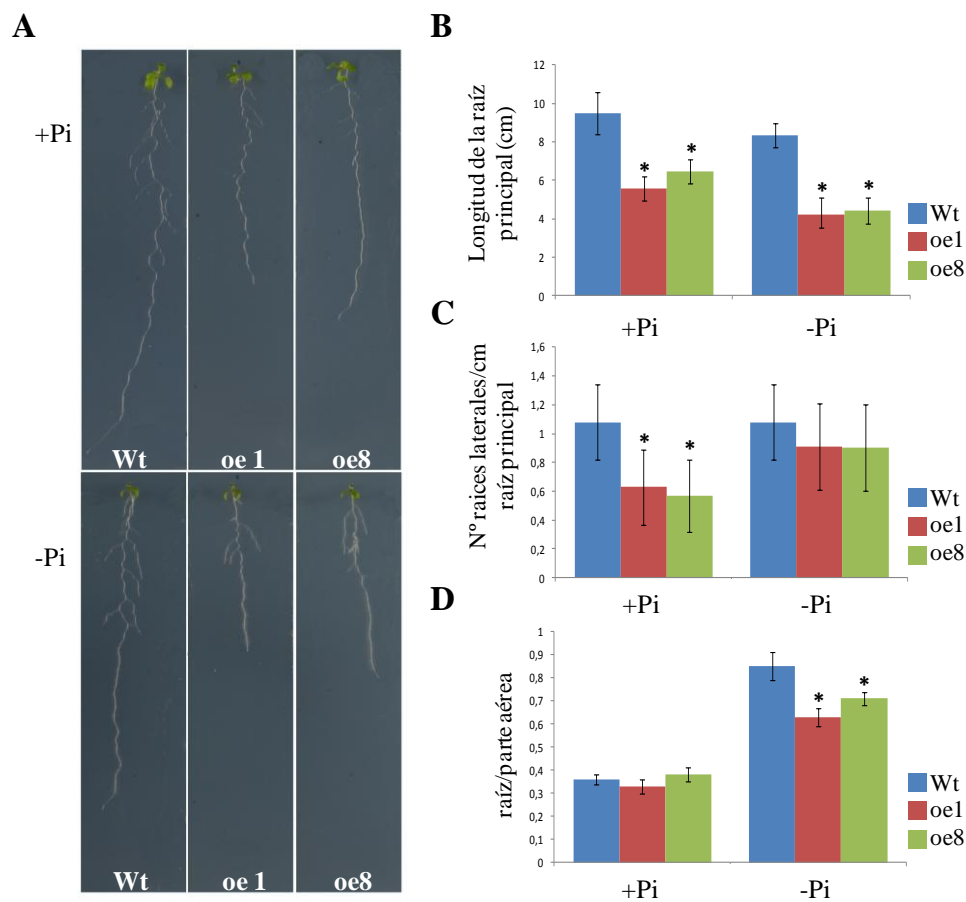
Respecto a las líneas RNAi-bHLH149 no se apreciaron diferencias fenotípicas significativas en la parte aérea al cultivarlas en medio con Pi. Sin embargo, cuando se sembraron en medio sin el macronutriente, los cotiledones mostraron un adelanto en la senescencia en relación al genotipo silvestre (Figura 19A). Esta aceleración no se observó al cultivar estas mismas líneas en otras condiciones nutricionales que inducen la senescencia, como la baja concentración de nitrato (Figura 19A).



**Figura 19** A) Detalles de las partes aéreas de dos líneas independientes portadoras de la sobreexpresión de *bHLH149* (oe1 y oe8) y dos líneas portadoras de la construcción de interferencia de *bHLH149* (6i y 7i) así como del genotipo silvestre (Wt). Las plantas se cultivaron durante 11 días en medio completo (+Pi), sin Pi (-Pi) y a baja concentración de nitrógeno (0,1 mM). B) Detalle de las rosetas de plantas procedentes de las líneas antes mencionadas cultivadas en el invernadero durante 27 días.

Cuando se someten las plantas a estrés por carencia de Pi, desarrollan una serie de respuestas morfológicas como son el aumento en la proporción raíz/parte aérea, disminución de la tasa de crecimiento de la raíz principal y aumento en el número de raíces laterales y de pelos radiculares (Bates y Lynch, 1996; López-Bucio y col., 2003). Para estudiar el posible papel de *bHLH149* en la respuesta frente a la carencia de Pi se estudió la arquitectura radicular en las líneas RNAi-*bHLH149* y ox-*bHLH149*. Para ello, se sembraron las plantas en medio completo y sin Pi en placas verticales para poder observar la morfología de la raíz (Figura 20A). La arquitectura radicular de las líneas RNAi-*bHLH149* no mostró alteraciones significativas con respecto al genotipo silvestre (datos no mostrados). Las líneas ox-*bHLH149*, por el contrario, mostraron una disminución significativa en la longitud de la raíz principal respecto de la del genotipo silvestre tanto en medio con Pi (entre 41% y 32%) como en medio sin Pi (46 % en ambas líneas) (Figura 20A y B). El número de raíces laterales por centímetro de raíz

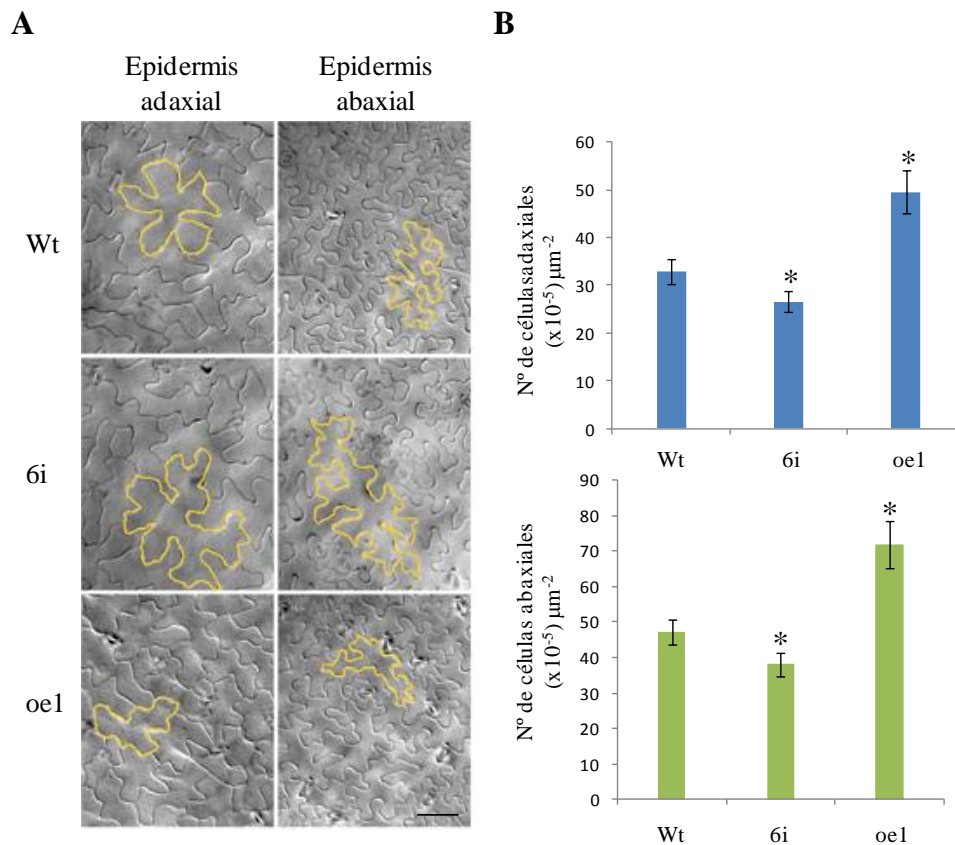
principal mostró un descenso en relación al control al cultivar las plantas en un medio completo, si bien, este efecto no se observó al cultivar las plantas sin Pi (Figura 20C). Asimismo, el coeficiente de biomasa entre raíz y parte aérea se redujo de manera significativa en las líneas ox-*bHLH149* cultivadas en medio sin Pi, ya que en esta condición la parte aérea era semejante a la del genotipo silvestre, a diferencia de lo que ocurría en medio completo, en el que la parte aérea de estas líneas era más pequeña (Figura 20D).



**Figura 20** Arquitectura radicular de dos líneas independientes portadoras de sobreexpresión de *bHLH149* (oe1 y oe8) así como del genotipo silvestre (Wt). A) Plantas cultivadas en placas verticales durante 11 días en medio sin Pi (-Pi) y en medio completo (+Pi). B) Longitud de la raíz principal (cm) en las mismas condiciones que las mostradas en A. En azul se representa el genotipo silvestre y en rojo y verde las dos líneas de sobreexpresión de *bHLH149* (oe1 y oe8 respectivamente). C) N° de raíces laterales/longitud de raíz principal. D) Coeficiente raíz/parte aérea de plantas cultivadas durante 11 días en medio completo (+Pi) y en medio sin Pi en placas verticales. El asterisco indica diferencias significativas respecto al genotipo silvestre mediante la aplicación del test T-Student ( $p < 0,05$ ,  $n = 30$ ).

La reducción en la biomasa puede deberse a dos causas: defectos en la división o en la elongación celular. Como se había observado disminución de la biomasa en líneas que sobreexpresaban *bHLH149*, se decidió examinar el tamaño celular en todas las

líneas en estudio. Para ello, se observó mediante microscopía óptica la epidermis del primer par de hojas. El número de células por unidad de superficie epidérmica era ligeramente menor en la línea RNAi-*bHLH149* (6i) que en el genotipo silvestre, al contrario de lo que ocurría en la línea ox-*bHLH149* (oe1), donde había más células por superficie (Figura 21A y B). No se apreciaron diferencias significativas entre la epidermis adaxial y la abaxial. De estos resultados se puede concluir que *bHLH149* participa como regulador negativo del tamaño celular.



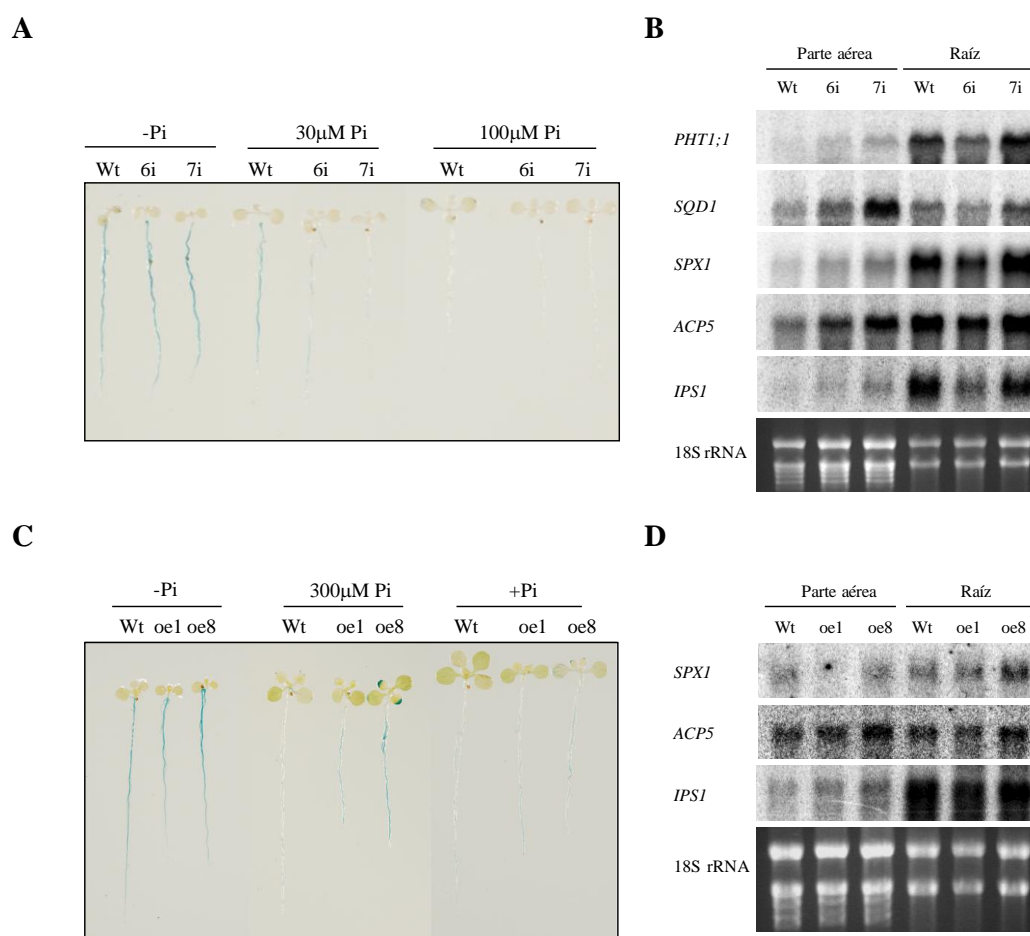
**Figura 21** A) Imágenes de microscopía óptica de la epidermis del primer par de hojas de las líneas de genotipo silvestre (Wt), de interferencia de *bHLH149* (6i) y de sobreexpresión de *bHLH149* (oe1). Las plantas se cultivaron durante 21 días en el invernadero. La barra de escala corresponde a 20  $\mu\text{m}$ . B) Cuantificación del número de células epidérmicas ( $\times 10^{-5}$ ) por  $\mu\text{m}^2$  de superficie foliar. El asterisco indica diferencias significativas respecto al genotipo silvestre mediante la aplicación del test T-Student ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ).

## 6.2 Caracterización molecular

Como caracterización adicional de la alteración de la expresión de *bHLH149* en relación a las respuestas del ayuno de Pi, se decidió analizar a nivel molecular la expresión de una serie de genes marcadores de la respuesta al ayuno de Pi. Dado que las líneas transgénicas obtenidas eran también portadoras de la construcción *pIPS1::GUS*

que responde a la deficiencia de Pi (Martín y col., 2000), se estudió en primer lugar la expresión del gen delator. Para ello se sembraron las líneas de interferencia y de sobreexpresión de *bHLH149* en distintas concentraciones de Pi y se analizó la actividad GUS de la construcción *pIPS1::GUS*. Respecto a las líneas RNAi-bHLH149 se observó una disminución de la actividad GUS a 30  $\mu$ M de Pi a los 7 días, siendo similar al genotipo silvestre en el resto de las condiciones analizadas (Figura 22A). En relación a las líneas ox-bHLH149 se observó un incremento de la actividad GUS en la raíz a 300  $\mu$ M de Pi (Figura 22C). No se detectaron diferencias en las plantas cultivadas en medio sin Pi ni en medio completo (Figura 22D). Posteriormente, se realizaron hibridaciones tipo *northern* para comprobar si el patrón histoquímico observado se correspondía con la expresión del gen endógeno, así como para estudiar la expresión de otros genes marcadores de la respuesta a la carencia de Pi. En el caso de las líneas RNAi-bHLH149 se observó una leve disminución en los niveles de transcripción de *IPS1* en la raíz (Figura 22B). No se detectaron diferencias significativas en el resto de los marcadores analizados (Figura 22B). En las líneas ox-bHLH149 se observó un leve incremento en los niveles de transcripción del gen *IPS1* en las raíces, no detectándose cambios significativos en el resto de los marcadores analizados (Figura 22D).



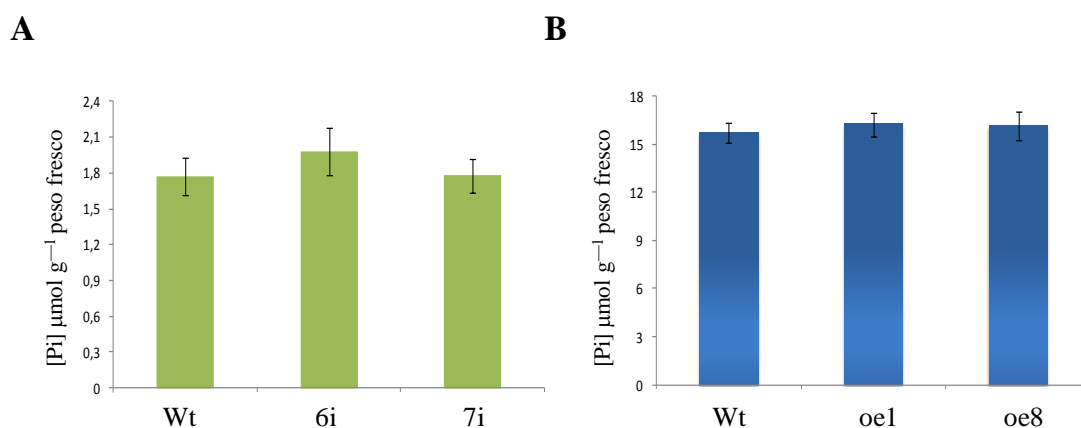


**Figura 22** A) Ensayo GUS de plantas portadoras de las construcciones *pIPS1::GUS* y de interferencia de *bHLH149* (6i y 7i) así como del genotipo silvestre (Wt) cultivadas durante 7 días en medios sin Pi (-Pi), a 30 μM y a 100 μM de Pi. B) Ensayos de tipo *northern* de partes aéreas y de raíces de plantas cultivadas durante 7 días con 30 μM de Pi. C) Ensayo GUS de plantas portadoras de las construcciones *pIPS1::GUS* y *35S::HA-bHLH149* (oe1 y oe8) y de la línea parental *pIPS1::GUS* (Wt). Las plantas se cultivaron durante 10 días en medios sin Pi (-Pi), a 300 μM de Pi y en medio completo. D) Hibridaciones tipo *northern* de las líneas anteriormente mencionadas cultivadas con una concentración de 300 μM de Pi durante 11 días.

### 6.3. Niveles de Pi intracelular libre

Otra consecuencia del estrés por ayuno de Pi es la disminución del contenido de Pi intracelular libre en las hojas. Además, se ha descrito que diferentes mutaciones de genes que participan en la modulación de esta respuesta provoca el aumento o la disminución del contenido de Pi en las células foliares (Delhaize y Randall, 1995, Rubio y col. 2001, González y col., 2005; Catarcha y col., 2007). Para evaluar si la alteración de los niveles de *bHLH149* afecta al contenido de Pi intracelular libre, se cultivaron las líneas transgénicas y el genotipo silvestre en medio completo durante 12 días. No se observaron diferencias significativas con respecto al genotipo silvestre en ninguna de las líneas analizadas (datos no mostrados), por lo que se cuantificó de nuevo

el contenido de Pi pero en las condiciones de cultivo en las cuales se observó alguna diferencia a nivel molecular respecto al control. En el caso de las líneas RNAi-*bHLH149* se midió la cantidad de Pi intracelular libre de la parte aérea en plantas cultivadas a 30  $\mu\text{M}$  de Pi durante 7 días, y en el caso de las líneas ox-*bHLH149*, en plantas cultivadas durante 10 días a 300  $\mu\text{M}$  de Pi. En ninguna de las condiciones analizadas se observaron diferencias significativas respecto al genotipo silvestre (Figura 23).



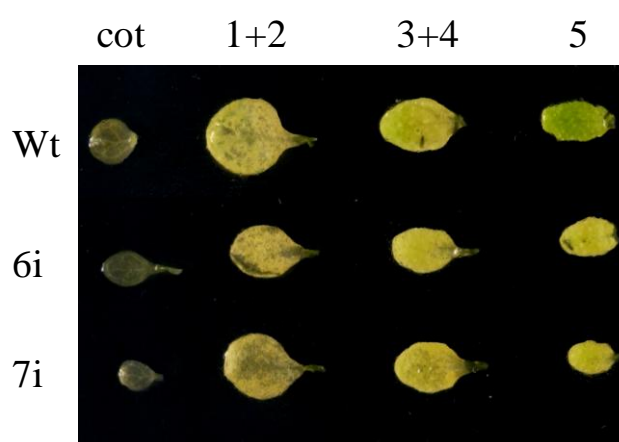
**Figura 23** A) Contenido de Pi intracelular libre de la parte aérea de las líneas con actividad disminuida de *bHLH149* (6i y 7i) así como del genotipo silvestre (Wt) cultivadas durante 7 días en un medio con 30  $\mu\text{M}$  de Pi. B) Contenido de Pi intracelular libre de la parte aérea de plantas portadoras de la sobreexpresión de *bHLH149* (oe1 y oe8) así como del genotipo silvestre cultivadas durante 10 días en un medio con 300  $\mu\text{M}$  de Pi.

#### 6.4. Influencia de *bHLH149* en respuesta a hormonas

Las citoquininas reprimen la expresión de una gran parte de los genes de respuesta frente a la carencia de Pi en la raíz (Martín y col., 2000; Franco-Zorrilla y col., 2002 y 2005). Además, la adición exógena de estas hormonas provoca una disminución en la longitud de la raíz principal, inhibe la formación de raíces laterales y retrasa la senescencia en las hojas (Salama y Wareing, 1979; Wagner y Beck, 1993; Ori y col., 1999). En base a estos antecedentes, se estudió el comportamiento de las líneas transgénicas frente a la aplicación exógena de citoquininas. Para ello, se sembraron las líneas ox-*bHLH149* y RNAi-*bHLH149* en medios con Pi y sin Pi y con distintas concentraciones de citoquinina, no observándose ninguna diferencia fenotípica respecto al genotipo silvestre ni en la parte aérea ni en el tamaño de la raíz (datos no mostrados).

Uno de los procesos fisiológicos en el que están implicadas las citoquininas es en el retraso de la senescencia en las hojas (Ori y col., 1999). Como previamente se observó que la expresión de este gen era mayor en las hojas más jóvenes y disminuía a

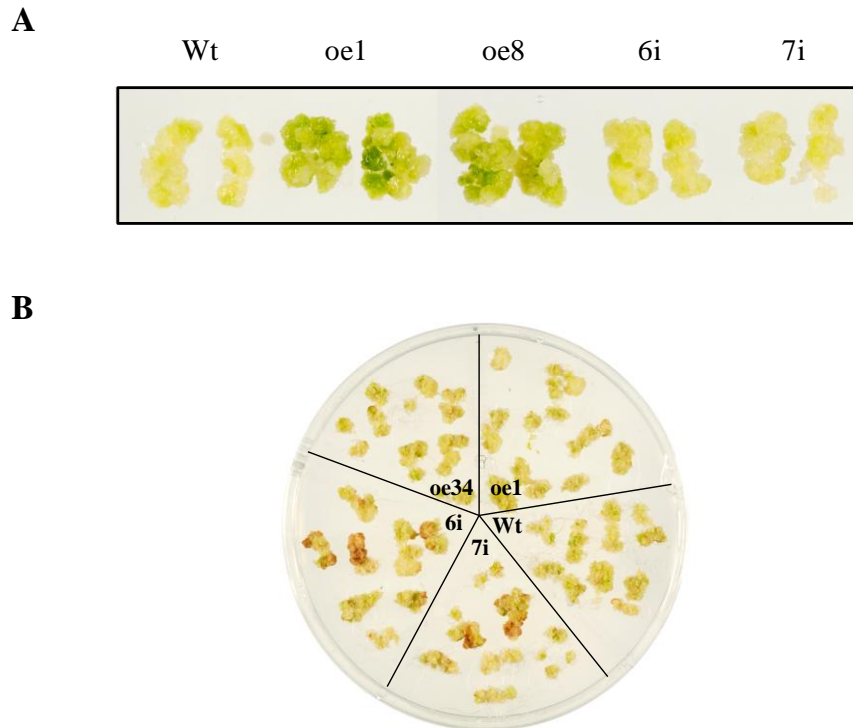
lo largo del desarrollo foliar se realizaron experimentos de inducción de la senescencia en las hojas. Para ello se extirparon las hojas de las rosetas, se incubaron en agua y en oscuridad y se evaluó la senescencia mediante la visualización de las clorofilas. Así se observó que las hojas jóvenes de las líneas 6i y 7i contenían menos clorofilas tras el tratamiento, indicando un adelanto en la senescencia (Figura 24). Como las líneas ox-bHLH149 presentaban un leve retraso en el crecimiento, no se pudo realizar este ensayo, debido a la imposibilidad de comparar hojas equivalentes en el mismo estadio de desarrollo.



**Figura 24** Hojas extirpadas de plantas cultivadas en medio completo durante 13 días e incubadas en agua y en oscuridad durante 8 días. Las líneas analizadas fueron el genotipo silvestre (Wt) y las plantas portadoras de la construcción de interferencia de *bHLH149* (6i y 7i). En la parte superior se indica el estadio de desarrollo de las hojas en función de la edad. 1+2, primer par de hojas; 3+4, segundo par de hojas; 5, hoja quinta.

Otra forma de evaluar la sensibilidad a citoquininas es analizar la capacidad de generar callos en presencia de la hormona. Para estudiar si dicha sensibilidad estaba alterada en nuestras líneas en estudio, se realizaron experimentos de inducción de callos a partir de explantos de raíz de los diferentes genotipos con citoquininas (kinetina 60 ng/mL) y con una concentración constante de auxinas (2,4-D 100 ng/mL). Los callos de las dos líneas ox-bHLH149 fueron mayores y más verdes que los generados a partir de plantas control, lo que está de acuerdo con la posibilidad de que los explantos procedentes de estas líneas sean más sensibles a la kinetina. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los callos generados a partir de las líneas RNAi-bHLH149 (Figura 25A). Asimismo, realizamos un ensayo de inducción de senescencia en los callos regenerados de todos los genotipos analizados. Para ello, se colocaron los

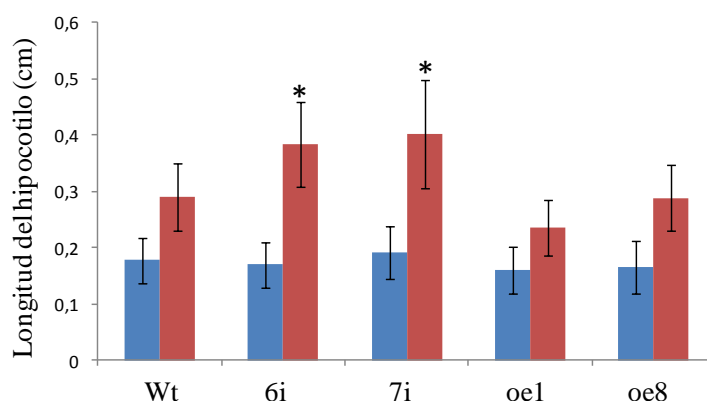
explantos de todas las líneas en estudio en placas de medio completo sin ningún tipo de aporte hormonal y se incubaron en oscuridad durante 20 días para inducir la senescencia. Como se puede observar en la Figura 24B, los callos generados a partir de las líneas 6i y 7i se tornaron marrones antes que el genotipo silvestre, indicativo de la aceleración de la senescencia.



**Figura 25** A) Callos de explantos de raíces de las líneas de sobreexpresión (oe1 y oe8), de las líneas con actividad disminuida (6i y 7i) de *bHLH149* y del genotipo silvestre (Wt) cultivadas durante 35 días en medio de inducción (100 ng/mL de 2,4D y 60 ng/mL de kinetina). B) Callos de raíces de las líneas de sobreexpresión (oe1 y oe8) y de las líneas con actividad disminuida (6i y 7i) así como del genotipo silvestre inducidos en medio completo suplementado con 100 ng/mL de 2,4-D y 60 ng/mL de kinetina y posteriormente transferidos a un medio sin aporte hormonal durante 20 días en oscuridad.

En la bibliografía se ha descrito que cuando las plantas crecen en medios con bajas concentraciones de Pi se produce un descenso en los niveles de giberelinas activas (Jiang y col., 2007). Este hecho se correlaciona con un incremento en la acumulación de la proteína RGA que modula diversas respuestas adaptativas al estrés por carencia de Pi, tales como la acumulación de antocianinas y el crecimiento de pelos radicales (Jiang y col., 2007). Puesto que previamente se había observado una inducción en la transcripción del gen *bHLH149* por GA<sub>3</sub> (Apartado 4.3) se decidió estudiar la respuesta de las líneas de sobreexpresión y con actividad disminuida de *bHLH149* frente al aporte

exógeno de giberelinas. Para ello se cultivaron las líneas transgénicas durante 9 días en medio con Pi y en presencia o en ausencia de la hormona y se midió la longitud de los hipocotilos. No se observaron cambios significativos en la longitud del hipocotilo en las líneas ox-bHLH149 respecto al genotipo silvestre (Figura 26). Por el contrario, la longitud de los hipocotilos de las líneas RNAi-bHLH149 (6i y 7i) era un 33% y un 37% mayor, respectivamente, respecto al control en presencia de la hormona (Figura 26). De estos resultados se puede concluir que las líneas con actividad disminuida de *bHLH149* son más sensibles a la adición exógena de giberelinas. Cabe destacar, que la longitud de los hipocotilos de las líneas oe1 y oe8 era ligeramente menor que la que presentaba el genotipo silvestre si bien las diferencias no fueron significativas.



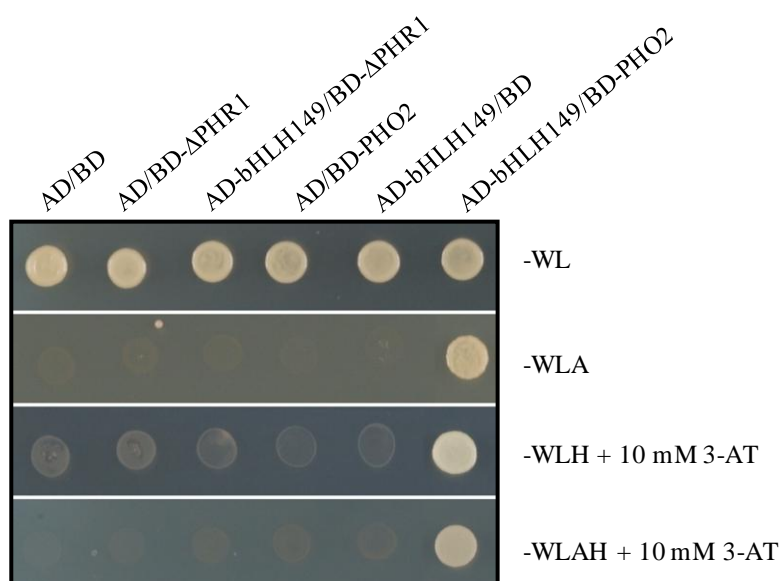
**Figura 26** Longitud de los hipocotilos (cm) de plantas portadoras de la sobreexpresión (oe1 y oe8) y de las líneas de interferencia (6i y 7i) así como del genotipo silvestre (Wt) cultivadas durante 9 días en medio completo (azul) y en medio completo con 30  $\mu$ M de GA<sub>3</sub> (rojo). El asterisco indica diferencias significativas respecto al genotipo silvestre mediante la aplicación del test T-Student ( $p < 0,05$ ,  $n = 32$ ).

## 7. INTERACCIÓN DE BHLH149 CON OTROS COMPONENTES REGULADORES DE LA RUTA DE RESPUESTA AL AYUNO DE Pi

### 7.1 Interacción de bHLH149 con PHR1 y PHO2

Como se ha indicado anteriormente, bHLH149 se identificó por su interacción física con SPX1, un componente clave en la regulación negativa de las respuestas al ayuno de Pi. Para comprobar si la proteína bHLH149 interaccionaba con otros componentes reguladores de la respuesta al ayuno de Pi se examinaron las interacciones con PHR1 y PHO2. Como sistema para estudiar estas posibles interacciones se usó la

técnica de los dos híbridos en levaduras. Para dichos ensayos se utilizó como cebo bHLH149 fusionado al AD y como presa una delección de PHR1 ( $\Delta$ PHR1) así como la proteína PHO2 fusionados ambas al BD. La delección de PHR1 se obtuvo al eliminar el fragmento autoactivador (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultados sin publicar). Tal y como se muestra en la Figura 27, no se observó interacción de bHLH149 con  $\Delta$ PHR1 aunque sí con PHO2. Además el híbrido obtenido mostró una interacción fuerte ya que creció en condiciones restrictivas (-WLAH + 10 mM de 3-AT) (Figura 27).



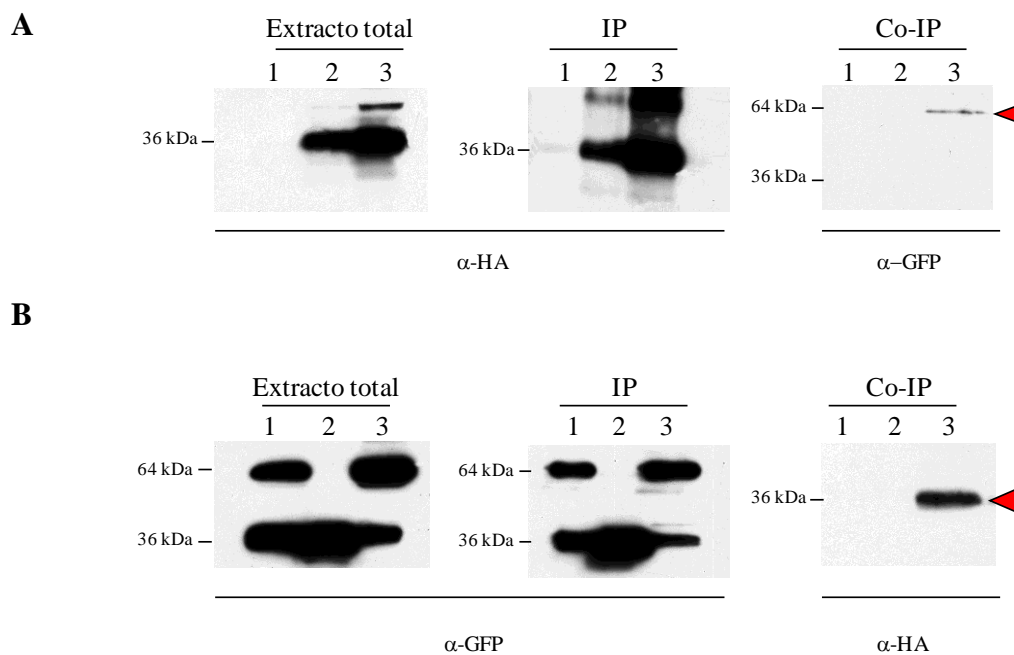
**Figura 27** Crecimiento en distintos regímenes auxotróficos de las cotransformaciones indicadas. Con AD y BD se representan los vectores vacíos.

## 7.2 Estudio de la interacción de la proteína bHLH149 con SPX1

### 7.2.1 Interacción *in planta* de ambas proteínas

Como SPX1 y bHLH149 interaccionan fuertemente en el sistema de los dos híbridos en levaduras se comprobó si esta interacción se produce *in planta* realizando ensayos de co-inmunoprecipitación. Para ello se fusionaron los dos cDNAs (*SPX1* y *bHLH149*) a dos epítomos diferentes que permitieran la detección de los complejos proteicos mediante el uso de anticuerpos específicos de cada construcción. Esta serie de ensayos se realizó inicialmente mediante la expresión transitoria de las diferentes combinaciones de construcciones en hojas de *N. benthamiana*. En particular las combinaciones analizadas fueron: (1) SPX1-GFP + HA (5,9 kDa) y (2) HA-bHLH149 + GFP (27 kDa) como controles negativos y (3) SPX1-GFP (57 kDa) + HA-bHLH149

(29,4 kDa), todas ellas bajo el control del promotor 35S (Figura 28). Las diferentes combinaciones se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana*, se prepararon los extractos proteicos y se inmunoprecipitaron con anticuerpo  $\alpha$ -HA. Al incubar dichas muestras con  $\alpha$ -GFP se detectó la proteína SPX-GFP en la muestra en la que se habían coexpresado HA-bHLH149 y SPX-GFP (Figura 28A). De la misma manera, al inmunoprecipitar con  $\alpha$ -GFP e incubar con el anticuerpo  $\alpha$ -HA, se detectó la proteína HA-bHLH149 en la muestra en la que se habían coexpresado ambas proteínas (Figura 28B). Estos resultados demuestran la interacción de ambas proteínas expresadas de forma transitoria en hojas de *N. benthamiana*.

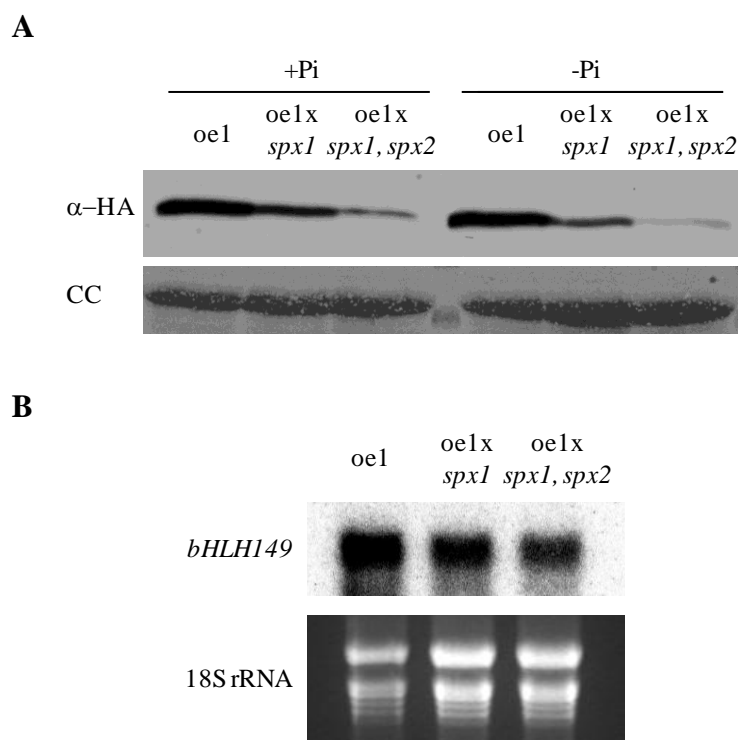


**Figura 28** Ensayos de tipo *western* para la detección de las proteínas coimmunoprecipitadas. Las muestras analizadas fueron la coexpresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* de las proteínas SPX1-GFP+HA (1), HA-bHLH149+GFP (2) y SPX1-GFP+HA-bHLH149 (3). La detección inmunológica de las proteínas de fusión se realizó mediante un anticuerpo anti-HA ( $\alpha$ -HA) o un anticuerpo anti-GFP ( $\alpha$ -GFP). En A se muestra la inmunoprecipitación (IP) de las proteínas fusionadas a HA. En B se muestra la inmunoprecipitación de las proteínas fusionadas a GFP. Las proteínas coimmunoprecipitadas (Co-IP) en A se detectaron con el anticuerpo anti-GFP y con el anticuerpo anti-HA en B.

### 7.2.2 Interacciones genéticas entre *bHLH149* y *SPX1*

Con el objeto de estudiar las posibles interacciones genéticas entre *SPX1* y *bHLH149*, se realizaron cruzamientos encaminados a obtener diferentes combinaciones genéticas para ambos genes. En primer lugar se introgresó la línea ox-bHLH149 en el fondo genético doble mutante *spx1*, *spx2*. Tras el análisis de una F2 segregante, se

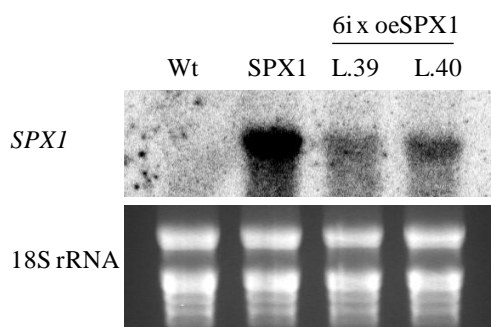
aislaron dos líneas portadoras de la construcción *oe1* tanto en fondo *spx1* como en *spx1, spx2*, no obteniéndose plantas ox-bHLH149 en fondo *spx2*. En las líneas aisladas se estudió la acumulación de la proteína HA-bHLH149 mediante *western*. En ambas líneas se observó una disminución de los niveles de proteína bHLH149, aunque dicho detrimento era aún mayor en las plantas portadoras de la doble mutación independientemente del régimen de Pi en el que se habían cultivado las plantas (Figura 29A). Mediante hibridaciones tipo *northern* se observó que las disminuciones en los niveles de proteína correlacionaron con una disminución en los niveles de la transcripción de la construcción *oe1* (Figura 29B). El resultado de estos experimentos sugiere la existencia de un mecanismo de cosupresión de la construcción *35S::HA-bHLH149* en los fondos mutantes *spx1* y *spx1, spx2*, posiblemente mediada por la existencia de secuencias comunes entre la construcción ox-bHLH149 y el T-DNA de las líneas *spx1, spx2* (Daxinger y col., 2007). Este hecho impidió el estudio de la interacción genética entre el *SPX1* y *bHLH149*.



**Figura 29** A) Ensayos de tipo *western* de extractos proteicos procedentes de plantas portadoras de la sobreexpresión de *bHLH149* (*oe1*), de la sobreexpresión de *bHLH149* en fondo mutante *spx1* (*oe1* x *spx1*) y la sobreexpresión de *bHLH149* en fondo doble mutante *spx1, spx2* (*oe1* x *spx1, spx2*) cultivadas en medio completo durante 10 días. B) Hibridación de tipo *northern* de las mismas líneas mostradas en A cultivadas en medio completo durante 10 días.

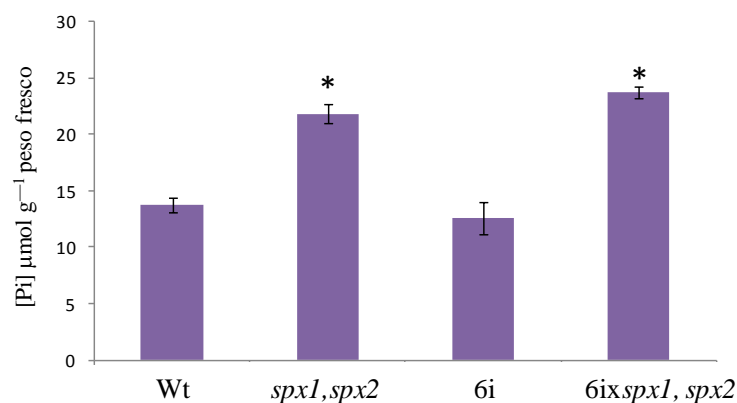


A continuación se cruzó una línea portadora de la sobreexpresión de *SPX1* con la línea 6i. Una vez obtenidas las líneas portadoras de ambas construcciones se midió el Pi intracelular libre de la parte aérea, ya uno de los efectos que provoca la sobreexpresión de *SPX1* es una reducción del 50% del contenido de Pi intracelular libre (M.I. Puga y J. Paz-Ares, datos sin publicar). Al analizar el contenido en Pi de la línea obtenida se observó que los niveles eran como los del genotipo silvestre y el parental 6i (datos no mostrados). Mediante hibridaciones tipo *northern* se comprobó que los efectos observados en la acumulación de Pi en la parte aérea se debían a una disminución en los niveles de transcripción de la sobreexpresión de *SPX1* (Figura 30) debido, probablemente, a fenómenos de cosupresión entre ambas construcciones. Esta combinación genética no permitió realizar el estudio de la interacción genética entre ambos genes.



**Figura 30** Hibridación de tipo *northern* de plantas portadoras de la sobreexpresión de *SPX1* (SPX1), y de dos líneas independientes (L.39 y L.40) portadoras de la construcción de interferencia de *bHLH149* y de la sobreexpresión de *SPX1* (6i x oeSPX1) así como del genotipo silvestre (Wt) cultivadas en medio completo durante 10 días.

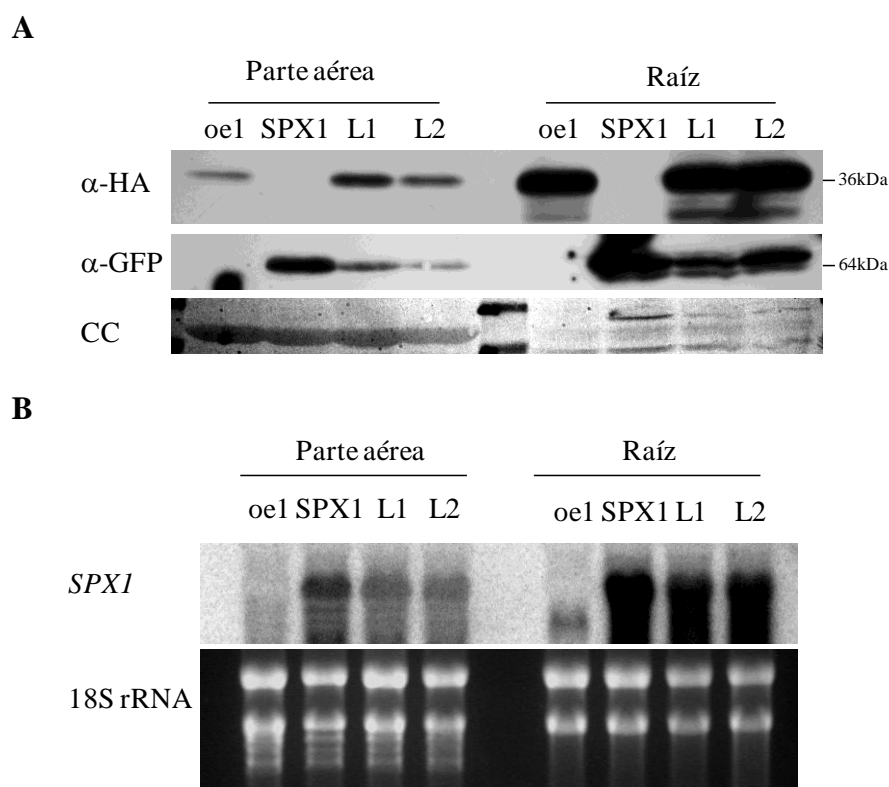
Posteriormente, se cruzó la línea 6i con el doble mutante *spx1,spx2*. Una vez obtenido el triple mutante, se determinó el contenido de Pi intracelular libre. Como se puede observar en la Figura 31, el contenido de Pi intracelular libre resultó ser aproximadamente el doble respecto del genotipo silvestre al igual de lo que ocurría en el doble mutante *spx1, spx2* (M.I. Puga y J. Paz-Ares, dato sin publicar). Además, la línea 6i x *spx1,spx2* poseía algunas características fisiológicas propias del doble mutante, como una mayor acumulación de antocianinas (M.I. Puga y J. Paz-Ares, datos sin publicar). Estos resultados apuntan a que no existe relación genética entre ambos genes en lo que se refiere a los mecanismos de la homeostasis de Pi ni en la acumulación de antocianinas en respuesta al ayuno de Pi.



**Figura 31** Contenido de Pi intracelular libre de la parte aérea de plantas portadoras de la construcción de interferencia de *bHLH149* en fondo doble mutante *spx1, spx2* (6i x *spx1, spx2*), así como de los parentales y del genotipo silvestre (Wt). Las medidas se tomaron en plantas cultivadas durante 11 días en medio con 500  $\mu\text{M}$  de Pi. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas respecto al Wt mediante la aplicación del test T-Student ( $p < 0,05$ ).

### 7.2.3 Análisis fisiológico de la interacción bHLH149-SPX1

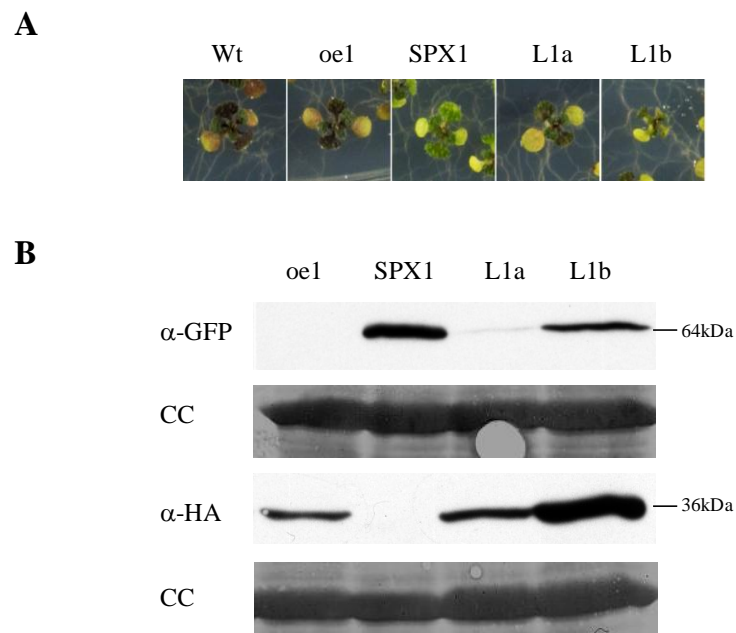
Se generaron plantas portadoras de las construcciones ox-bHLH149 (oe1) y 35S::SPX1-GFP (oeSPX1) mediante cruzamiento. Una vez obtenidas las líneas portadoras de ambas sobreexpresiones en homocigosis (L1 y L2), se analizaron los niveles de acumulación de las dos proteínas de fusión mediante ensayos de tipo *western*. Como se puede observar en la Figura 32A, los niveles de HA-bHLH149 en las líneas procedentes del cruce eran similares al parental tanto en la parte aérea como en la raíz. Sin embargo, los niveles de SPX1-GFP eran más bajos en las líneas cruzadas que en la línea parental, tanto en la parte aérea como en la raíz. Con el objeto de comprobar si esta disminución en los niveles de proteína se debía a una regulación post-traducciona l o a una disminución en los niveles de transcripción, se realizaron hibridaciones tipo *northern*. Así, se observó que los niveles de transcripción de la sobreexpresión de *SPX1* en las líneas cruzadas eran menores que en la línea parental (Figura 32B), sugiriendo un fenómeno de silenciamiento de la construcción oeSPX1.



**Figura 32** A) Ensayos de tipo *western* de extractos proteicos procedentes de partes aéreas y de raíces. Las líneas analizadas fueron plantas portadoras de la sobreexpresión de *bHLH149* y de la sobreexpresión de *SPX1-GFP* (L1 y L2) así como los parentales correspondientes cultivadas en medio completo durante 10 días. La detección de las proteínas de fusión se realizó mediante un anticuerpo anti-HA ( $\alpha$ -HA) o un anticuerpo anti-GFP ( $\alpha$ -GFP). B) Hibridación de tipo *northern* de plantas de las líneas anteriormente mencionadas cultivadas en medio completo durante 10 días.

Aunque los niveles de acumulación de la proteína SPX1-GFP eran menores en las líneas cruzadas respecto a la línea parental se utilizaron estas plantas para estudiar el efecto de la expresión ectópica de *SPX1* y *bHLH149*. Una de las características fenotípicas de la línea que sobreexpresa *SPX1* es que acumula menos antocianinas cuando se cultivan las plantas a bajas concentraciones de Pi (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultados sin publicar). Al cultivar las líneas portadoras de ambas sobreexpresiones (L1), se observó que había dos tipos de plantas: unas con mayor acumulación de antocianinas y de mayor tamaño (L1a), semejantes fenotípicamente a la línea ox-*bHLH149*, y otras más pequeñas y más claras (L1b) (Figura 33A). Se recogieron las plantas de los dos fenotipos y se analizaron los patrones de acumulación de las proteínas SPX-GFP y HA-*bHLH149*. Como se puede observar en la Figura 33B, las plantas de la línea L1b mostraron una mayor acumulación de proteína SPX-GFP que las plantas con mayor biomasa, si bien ésta no alcanzaba los niveles del parental oeSPX1. Además, en

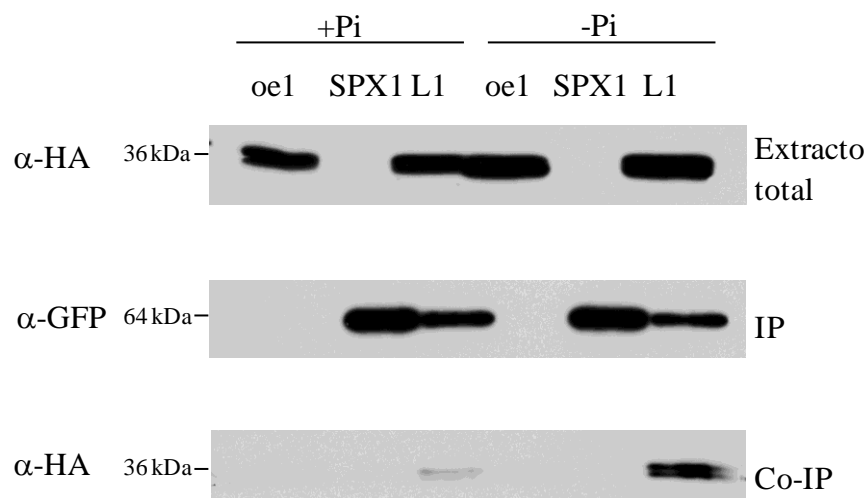
las plantas de menor tamaño se acumulaba incluso más proteína HA-bHLH149 que en la línea parental (oe1). Sin embargo, cuando se cultivaron estas mismas líneas en medio completo, no se observó ninguna diferencia en cuanto al tamaño de la roseta ni la acumulación de antocianinas (dato no mostrado). Estos resultados apuntan que la proteína SPX1 controla la acumulación de bHLH149 en condiciones de bajo Pi.



**Figura 33** A) Detalle de la parte aérea de plantas cultivadas durante 22 días en un medio con 30  $\mu$ M de Pi. Las líneas analizadas fueron: plantas portadoras de la sobreexpresión de *bHLH149* y de la sobreexpresión de *SPX1* con la parte aérea grande y antocianinas semejantes al genotipo silvestre (L1a) y plantas de menor porte y menor acumulación de antocianinas que el genotipo silvestre (L1b) así como los parentales. B) Ensayos de tipo *western* de extractos proteicos de las misma líneas mostradas en A. La detección de las proteínas de fusión se realizó mediante un anticuerpo anti-HA ( $\alpha$ -HA) o un anticuerpo anti-GFP ( $\alpha$ -GFP).

Para comprobar si la interacción entre ambas proteínas dependía del estatus de Pi del medio de cultivo, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación utilizando una línea portadora de ambas construcciones (L1) así como las líneas parentales (oe1 y oeSPX1) (Figura 34). Los resultados obtenidos de la co-inmunoprecipitación indicaron que la interacción entre ambas proteínas era más efectiva cuando las plantas se cultivaron en ausencia de Pi (Figura 34), por lo que podemos concluir que SPX1 y bHLH149 interaccionan de manera dependiente del nivel de Pi en la planta. Además, al analizar la proteína HA-bHLH149 co-inmunoprecipitada junto con SPX1-GFP se observaron dos bandas definidas en las plantas cultivadas sin Pi, que no

se observaron en +Pi, debidas probablemente a la detección de distintas isoformas de HA-bHLH149 específicas de -Pi.



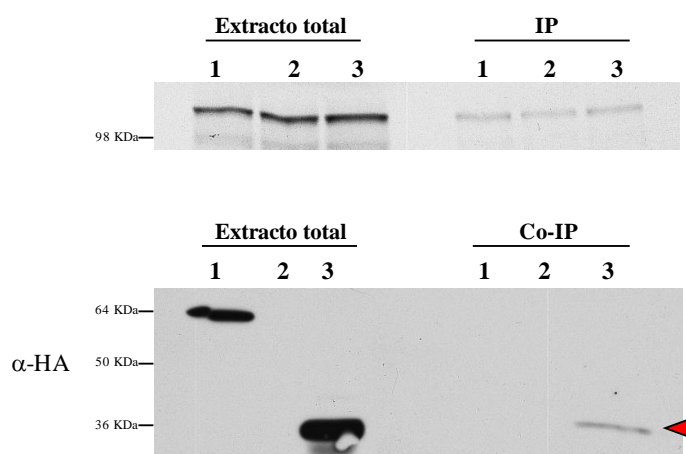
**Figura 34** Ensayos de tipo *western* de las co-inmunoprecipitaciones de extractos proteicos de plantas completas cultivadas durante 12 días en medio con Pi (+Pi) y sin Pi (-Pi). Las muestras analizadas fueron plantas portadoras de la sobreexpresión de *HA-bHLH149* (oe1), de la sobreexpresión de *SPX1-GFP* (oeSPX1) y la línea portadora de ambas construcciones (L1). La detección de las proteínas de fusión se realizó mediante un anticuerpo anti-HA ( $\alpha$ -HA) o un anticuerpo anti-GFP ( $\alpha$ -GFP).

### 7.3 Estudio de la interacción de la proteína bHLH149 con PHO2

#### 7.3.1 Interacción *in planta* de ambas proteínas

La proteína PHO2 está implicada en la homeostasis del Pi (Delhaize y Randall, 1995; Aung y col., 2006; Bari y col., 2006; Chiou y col., 2006). La pérdida de actividad de este gen se traduce en un incremento de la acumulación del Pi en la parte aérea provocado por un aumento en la absorción del macronutriente por las raíces y un incremento en la tasa de translocación de la raíz a la parte aérea (Chiou y col., 2006). Además, cuando se cultiva el mutante *pho2* en condiciones suficientes de Pi las hojas viejas desarrollan clorosis/necrosis debido al exceso de Pi (Chiou y col., 2006). Este fenotipo se debe a que no se produce la recirculación del nutriente de las hojas viejas a las jóvenes, lo que provoca la senescencia prematura de las hojas viejas (Chiou y col., 2006). Dado el papel importante de *PHO2* en la homeostasis del Pi y como previamente se había observado que las proteínas bHLH149 y PHO2 interaccionaban en el sistema de levaduras, se examinó si ambas proteínas interaccionaban *in planta*. Para ello, se expresó ectópicamente la proteína PHO2 fusionada a distintos epítomos en *Arabidopsis*.

Dado que no se detectó ninguna de las proteínas de fusión de PHO2 mediante *western* (datos no mostrados), se analizó dicha interacción mediante un sistema semi *in planta* basado en la traducción *in vitro* de *PHO2*. Para ello se obtuvo la proteína PHO2 fusionada al epítipo MYC (MYC-PHO2) mediante transcripción y traducción *in vitro* marcada radiactivamente (Figura 35). La proteína de fusión se incubó con extractos de *Arabidopsis* procedentes de la línea portadora de la sobreexpresión *HA-bHLH149* (oe1), plantas de genotipo silvestre (Wt), así como de plantas portadoras de la construcción *Pro<sub>FKF1</sub>::HA-FKF1* de la que se presume que no interacciona con PHO2, y que sirvió como control negativo (Figura 35). Los extractos se inmunoprecipitaron con anticuerpo  $\alpha$ -MYC y posteriormente se incubaron con el anticuerpo  $\alpha$ -HA (Figura 35). Así, se detectó HA-bHLH149 en la muestra incubada con MYC-PHO2, indicativo de la interacción entre ambas proteínas (Figura 35).

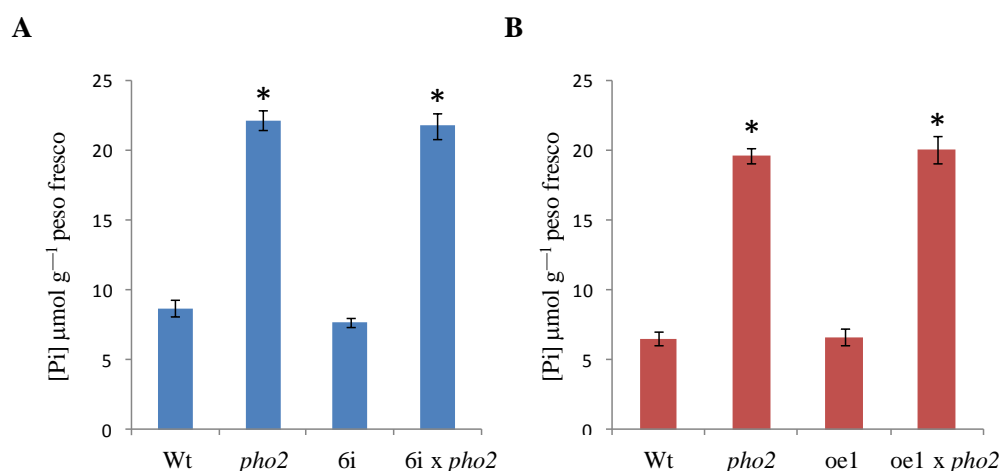


**Figura 35** En el panel superior se muestra la inmunoprecipitación con  $\alpha$ -MYC de la proteína  $\alpha$ -PHO2 traducida *in vitro*. En la parte inferior se muestran los ensayos de tipo *western* de las co-inmunoprecipitaciones (Co-IP). Los extractos proteicos utilizados procedían de plantas de *Arabidopsis* portadoras de la construcción *Pro<sub>FKF1</sub>::HA-FKF1* (1), de genotipo silvestre (2) y plantas portadoras de la construcción *35S::HA-bHLH149* (3) cultivadas en medio completo durante 12 días. Para la detección de las proteínas fusionadas al epítipo HA se utilizó un anticuerpo anti-HA ( $\alpha$ -HA). La punta de flecha indica la banda correspondiente a la proteína HA-bHLH149 coimmunoprecipitada junto con MYC-PHO2.

### 7.3.2 Interacciones genéticas entre *bHLH149* y *PHO2*

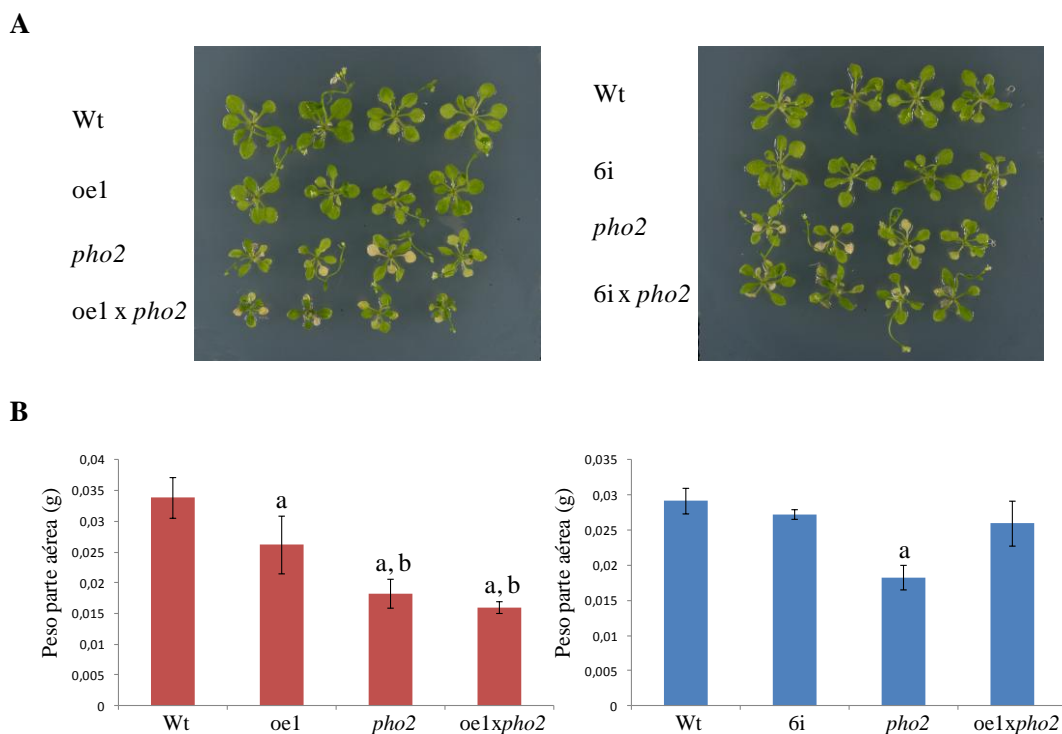
Para estudiar el significado funcional de la interacción entre las proteínas PHO2 y bHLH149 se realizaron cruzamientos para introgresar la mutación *pho2* en las líneas ox-bHLH149 y RNAi-bHLH149. Posteriormente se procedió a medir el contenido de Pi intracelular libre en los cruces obtenidos, ya que el mutante *pho2* es un hiperacumulador de Pi. Así se observó que tanto las plantas portadoras de la sobreexpresión de *bHLH149*

como las línea con actividad disminuida de *bHLH149*, ambas en fondo mutante *pho2*, hiperacumulaban Pi a niveles semejantes a los del mutante simple *pho2* (Figura 36A y B). De estos resultados podemos decir que el efecto hiperacumulador de Pi de la mutación *pho2* es independiente de los niveles de expresión del gen *bHLH149*.



**Figura 36** Contenido de Pi intracelular libre de la parte aérea de los distintos genotipos obtenidos. A) Las muestras analizadas corresponden a plantas portadoras de la construcción de interferencia de *bHLH149* en fondo *pho2* (*6i x pho2*) así como a las líneas parentales y al genotipo silvestre. B) Las muestras analizadas corresponden de la sobreexpresión de *bHLH149* en fondo mutante *pho2* (*oe1 x pho2*) así como a las líneas parentales y al genotipo silvestre. Las plantas se cultivaron durante 11 días en medio completo. El asterisco indica diferencias significativas respecto al genotipo silvestre mediante la aplicación del test T-Student ( $p < 0,05$ ).

Para estudiar la interacción genética entre *bHLH149* y *PHO2* en relación al crecimiento se sembraron todas las líneas en estudio en medio completo durante 21 días. En estas condiciones, se observó una disminución significativa en la biomasa respecto al genotipo silvestre en las líneas *pho2*, ox-*bHLH149* y de manera más acusada en la línea ox-*bHLH149* en fondo mutante *pho2* (Figura 37). Sin embargo, la línea RNAi-*bHLH149* en fondo mutante *pho2* presentó una biomasa semejante al genotipo silvestre (Figura 37). Estos resultados indican que *bHLH149* regula de manera negativa la producción de biomasa

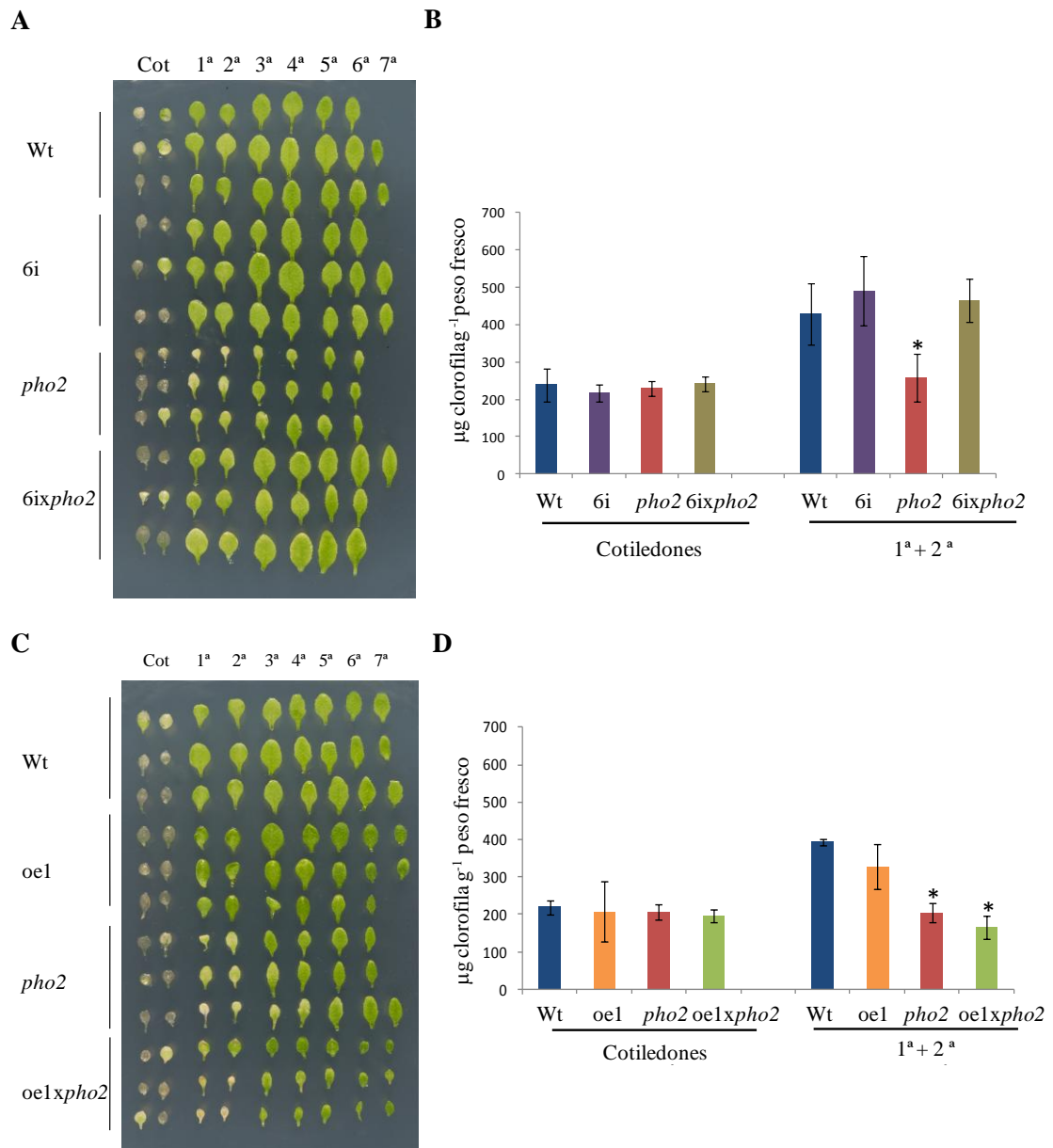


**Figura 37** A) Detalle de la parte aérea de plantas de la sobreexpresión y de interferencia de *bHLH149* en fondo genético *pho2* (oe1 x *pho2* y 6i x *pho2*), así como de los parentales y el genotipo silvestre. B) Medida del peso fresco de las rosetas de plantas de las líneas anteriormente mencionadas cultivadas durante 21 días en medio completo. El superíndice a indica la existencia de diferencias significativas respecto al genotipo silvestre. El superíndice b indica la diferencias significativas respecto a la línea de sobreexpresión de *bHLH149* (test T-Student  $p < 0,05$ ,  $n = 45$ ).

Otra característica del mutante *pho2* es que presenta una necrosis/aceleración en la senescencia en hojas viejas, probablemente producida por la toxicidad del Pi acumulado, debido a que no se produce la removilización del nutriente desde las hojas viejas a las jóvenes (Chiou y col., 2006, Aung y col., 2006; Delhaize y Randall, 1995). Así, se analizó el efecto de la alteración de la actividad de *bHLH149* en combinación con la pérdida de función de *PHO2* en relación a la senescencia foliar. Para ello, se diseccionaron las hojas de todos los genotipos en función de su estado de desarrollo y se evaluó su grado de senescencia mediante la cuantificación de clorofilas (Figura 38). De acuerdo con lo esperado, se observó un adelanto en la senescencia en el primer par de hojas en el mutante *pho2*, donde la acumulación de clorofilas era menor que en el genotipo silvestre (Figura 38A y B). En lo concerniente a la línea RNAi-*bHLH149*, no se observaron diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, en la línea 6i x *pho2* los niveles de clorofilas eran semejantes al genotipo silvestre (Figura 38A y B), reflejando la supresión del fenotipo de senescencia de *pho2*. En lo que se refiere a la línea ox-*bHLH149* en fondo mutante *pho2*, los niveles de clorofilas cuantificados en el



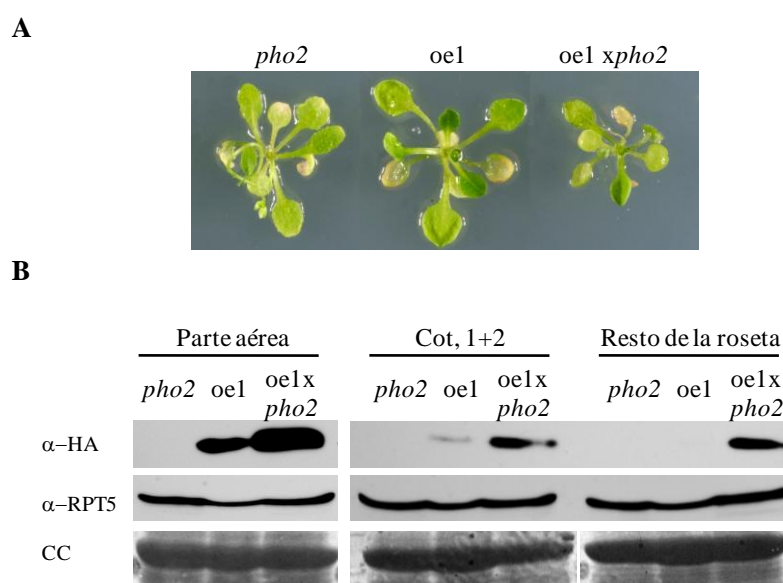
primer par de hojas fueron menores que en el genotipo silvestre e incluso menores que en el mutante *pho2* (Figura 38C y D). De los resultados obtenidos se puede decir que la disminución de la actividad de *bHLH149* en fondo genético *pho2* recupera el fenotipo silvestre en lo que se refiere a senescencia/muerte celular mientras que la sobreexpresión de *bHLH149* exacerba dicho fenotipo.



**Figura 38** A) Disección de la roseta de plantas cultivadas durante 21 días en medio completo. Las líneas analizadas fueron la línea portadora de la construcción de interferencia en fondo mutante *pho2* (6i x *pho2*) así como las líneas parentales y el genotipo silvestre. B) Contenido en clorofilas (µg clorofila/ g peso fresco) de los cotiledones y en el primer par de hojas. C) Disección de la roseta de plantas cultivadas durante 21 días en medio completo. Las líneas analizadas fueron la línea portadora de la sobreexpresión en fondo mutante *pho2* (oe1 x *pho2*) así como las líneas parentales y el genotipo silvestre. D) Contenido en clorofilas (µg clorofila/ g peso fresco) de las hojas diseccionadas de las líneas antes descritas. El asterisco indica diferencias significativas respecto al genotipo silvestre mediante la aplicación del test T-Student ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

### 7.3.3 Papel de PHO2 en la estabilidad de bHLH149

La proteína PHO2, como se ha mencionado antes, posee un dominio de conjugación a ubiquitina propio de enzimas E2 ubiquitina conjugasas (Smalle y Viestra, 2004). Este dominio cataliza la transferencia de ubiquitina a una E3 ubiquitina ligasa, la cual reconoce de manera específica a la proteína diana y la marca con el polipéptido de ubiquitina para su degradación vía proteosoma (Viestra, 2009). A pesar de que el papel fisiológico de PHO2 ha sido ampliamente estudiado (Delhaize y col., 1995; Aung y col., 2006; Bari y col., 2006; Franco-Zorilla y col., 2007; Pant y col., 2008; Lin y col. 2008), hasta la fecha no se ha profundizado en su función molecular ni en su posible papel en la ruta de degradación de proteínas por el proteosoma. Con el objeto de estudiar si la proteína PHO2 afecta a la estabilidad de la proteína bHLH149, se analizó la acumulación de la fusión HA-bHLH149 en fondo mutante *pho2* en plantas cultivadas durante 7 días con Pi y en ausencia de dicho macronutriente. No se observaron diferencias significativas en la acumulación de la proteína ni en la parte aérea ni en la raíz (dato no mostrado). De la misma manera se estudió la acumulación de la proteína en plantas de mayor edad (Figura 39A y B). En este caso, la acumulación de HA-bHLH149 resultó ser mayor en fondo *pho2*, independientemente del estadio de desarrollo de las hojas (Figura 39B). De estos resultados podemos concluir que la proteína PHO2 interviene en los procesos que modulan la acumulación de la proteína bHLH149 en la parte aérea de plantas adultas.



**Figura 39** A) Detalle de la parte aérea de plantas portadoras de la sobreexpresión de HA-bHLH149 en fondo mutante *pho2* (*oe1 x pho2*), parentales y genotipo silvestre (Wt) cultivadas durante 21 días. B) Ensayos de tipo *western* de extractos proteicos de partes aéreas de plantas de las líneas mostradas en A. Las partes analizadas fueron cotiledones (Cot), hojas primera y segunda (1+2) y resto de la roseta.

## 8. INTERACCIÓN DE bHLH149 CON OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA bHLH

La proteína bHLH149 está clasificada en el grupo de las proteínas que no poseen capacidad de unión al DNA ya que posee una región básica con pocos aminoácidos básicos, y además carece de los residuos Glu13/Arg16 que son críticos para la unión al DNA (Toledo-Ortiz y col., 2003). En los últimos años, se ha implicado a miembros de esta familia como reguladores negativos de la unión de otras proteínas bHLH al DNA mediante la formación de heterodímeros (Massari y Murre, 2000). Entre otros, se ha caracterizado a *KIDARI* como represor de *HFRI* (Hyun y Lee, 2006), a *PAR1* y *PAR2* como represores transcripcionales de genes de respuesta a auxinas y a brasinoesteroides (Bou-Torrent y col., 2008), y a la subfamilia AIF, de la que bHLH149 es miembro, como reguladores negativos de la señalización de brasinoesteroides mediante la interacción con el bHLH ATBS1 (Wang y col., 2009).

Con el objetivo de estudiar posibles interacciones de la proteína bHLH149 con otros miembros de la familia con capacidad de unión a DNA, se realizaron ensayos de los dos híbridos en levaduras. Para ello, se utilizó como cebo la proteína bHLH149 y como presa algunas proteínas bHLH con capacidad de unión a DNA implicadas en diversos procesos biológicos fusionadas al AD. Como se puede observar en la Tabla 5, la proteína bHLH149 interacciona con las proteínas BEE1 y BEE2 (Fiedrichsen y col., 2002), aunque la interacción bHLH149/BEE2 resultó ser más estable ya que el híbrido creció incluso en presencia de 3-AT. Tanto *BEE1* como *BEE2* son reguladores positivos de la respuesta a brasinoesteroides (Friedrichsen y col., 2002), por lo que bHLH149 podría participar como regulador negativo de la señalización mediada estas hormonas, a través de su interacción con BEE1 y BEE2.

**Tabla 5** Crecimiento en distintos regímenes auxotróficos de los cotrasformantes. Con el signo + se simboliza el crecimiento positivo, en el caso de ++ se simboliza el crecimiento positivo en presencia de 3-AT y con el signo – la ausencia de crecimiento. En todos los casos se utilizó la proteína bHLH149 fusionada al BD y el resto de las proteínas fusionadas al AD.

Id	ID	-WL	-WLAH	FUNCIÓN	REFERENCIA
<b>HFR1</b>	At1g02340	+	-	Señalización de fitocromos y criptocromos	Duek y Frankhauser (2003)
<b>PIF4</b>	At2g43010	+	-	Respuesta a luz y a giberelinas	Leivar y col. (2008)
<b>PIL2</b>	At3g62090	+	-	Respuesta a luz y a giberelinas	
<b>PIL6</b>	At3g59060	+	-	Respuesta a alta temperatura	Koini y col. (2009)
<b>MYC1</b>	At4g00480	+	-		
<b>BIM1</b>	At5g08130	+	-	Implicado en la señalización de brasinoesteroides	Yin y col. (2005)
<b>BEE1</b>	At1g18400	+	+	Regulador positivo de la señalización de brasinoesteroides	Friedrichsen y col. (2002)
<b>BEE2</b>	At1g35460	+	++		
<b>MYC2</b>	At1g32640	+	-	Señalización en respuesta a ABA, ácido jasmónico y luz azul	Abe y col. (2003) Lorenzo y col. (2004) Boter y col. (2004) Yadav y col. (2005)
<b>bHLH32</b>	At3g25710	+	-	Regulador negativo de la acumulación de antocianinas y la producción de pelos radiculares durante el ayuno de Pi	Chen y col. (2007)
<b>SPATULA</b>	At4g36930	+	-	Regulador del desarrollo del carpelo Mediador de las respuestas de germinación a la luz y la temperatura	Heisler y col. (2001) Penfield y col. (2005)
<b>ALCATRAZ</b>	At5g67110	+	-	Dehiscencia del fruto	Rajani y Sundaresan (2001)

## 9. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

Con el objeto de conocer los genes cuya expresión se alteraba en respuesta a la expresión ectópica o a la disminución de actividad de *bHLH149* se realizaron estudios transcriptómicos mediante la hibridación de micromatrices. Para ello se analizaron RNAs procedentes de tres réplicas biológicas de partes aéreas de la línea ox-bHLH149 (oe1) que se compararon con las correspondientes réplicas de la línea RNAi-bHLH149 (6i). Las plantas se cultivaron durante 7 días en medio completo y posteriormente se transfirieron a medio carente de Pi durante 4 días. A partir del análisis conjunto de las tres réplicas biológicas se obtuvieron los ratios de expresión relativa (oe1/6i) para cada uno de los genes representados en la micromatriz analizada (total 28897 genes), así como los valores de probabilidad asociados a cada valor de expresión diferencial. Se

consideraron genes significativamente inducidos en la línea ox-bHLH149 aquellos con un ratio de intensidad superior a 1,8 y un valor de probabilidad ajustada (FDR) inferior a 0,05. Análogamente, los genes con un ratio de intensidades inferiores a -1,8 y FDR inferior a 0,05 se consideraron como significativamente reprimidos ox-bHLH149. Como se puede observar en la tabla 7, 34 genes se reprimen y 10 genes se inducen. El gen que mostró mayor nivel de inducción (22 veces) fue *bHLH149* indicativo de la sobreexpresión del mismo. El hecho que el número de genes con la expresión alterada sea bajo podría deberse a que la regulación ejercida por *bHLH149* podría estar restringida a determinados tipos celulares. Respecto a los resultados obtenidos, observamos que se reprimen cuatro genes de la familia bHLH (*bHLH38*, *bHLH39*, *bHLH100* y *bHLH101*) que se inducen en condiciones de carencia de hierro (Wang y col., 2007). En la bibliografía se ha descrito que la inhibición de la elongación de la raíz principal que se produce durante la carencia de Pi, se puede deber a que durante el estrés aumenta la disponibilidad de hierro debido a la secreción de ácidos orgánicos que acidifican el medio (Ward y col., 2008; Hirsch y col., 2006). El exceso de hierro produce la parada en el crecimiento de la raíz (Ward y col., 2008; Hirsch y col., 2006). Como la sobreexpresión de bHLH149 produce una disminución en el crecimiento de la raíz, la represión de *bHLH38*, *bHLH39*, *bHLH100* y *bHLH101* podría reflejar un mecanismo de compensación para evitar una mayor reducción de tamaño.

Las proteínas bHLH se unen a una secuencia de seis nucleótidos conocida como motivo E (CANNTG) (Toledo-Ortiz y col., 2003). Existen diversas variantes del motivo E en función de la identidad de sus dos nucleótidos centrales, aunque el más común es el motivo G (CACGTG). Como la proteína bHLH149 interacciona al menos con otros dos proteínas bHLH como son BEE1 Y BEE2 se decidió comprobar si los genes cuya transcripción se inducía o se reprimía en las plantas que sobreexpresaban *bHLH149* poseían en la región promotora próxima (-500 pb desde el ATG) el motivo E en cualquiera de sus variantes. En los genes inducidos se observó un enriquecimiento significativo del motivo CAAGTG (Tabla7) y en los genes reprimidos un enriquecimiento significativo en la representación tanto del motivo G como de las cajas CAAGTG y CATGTG (Tabla 7). Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que la función de *bHLH149* es impedir la unión al DNA de otros bHLH con capacidad de unión al motivo CAHGTG.

**Tabla 6** Análisis transcriptómico del efecto de la alteración en los niveles de expresión de *bHLH149*. Las muestras analizadas fueron obtenidas a partir de la parte aérea de plantas cultivadas durante 7 días en suficiencia de Pi (+Pi) y posteriormente transferidas a medio sin el macronutriente durante 4 días. Con los signos + y – se representa inducción y represión respectivamente. En la última columna de la derecha se indican los ratios de expresión relativa para cada gen en plantas cultivadas en carencia de Pi respecto a plantas cultivadas en medio completo (Bustos y col., 2010).

Ratio de intensidades	FDR (RankProd)	ID	Descripción	ratio intensidades -Pi/+Pi
-4,81	0	At2g41240	bHLH100	
-4,2	0	At5g19470	ATNUDT 24 (Arabidopsis thaliana Nudix hydrolase homolog 24)	0,67
-4,12	0	At3g45095	Expressed protein	
-3,18	0	At3g56970	bHLH038/ORG2 (OBP3-responsive gene 2)	
-3,05	0,00333333	At4g15210	β-AMY (Beta amylase)	6,5
-3,03	0	At1g47400	similar to unknown protein	-4,07
-2,92	0,00166667	At5g59310	LTP4 (Lipid transfer protein 4)	5,73
-2,91	0,00125	At3g56980	bHLH039/ORG3 (OBP3-responsive gene 3)	-4,3
-2,87	0,01238095	At3g24982	Protein binding	-4,03
-2,79	0,00142857	At1g70270	Unknown protein	3,35
-2,67	0,008	At1g47395	Unknown protein	
-2,6	0,00692308	At3g02550	LBD41 (LOB domain-CONTAINING PROTEIN 41)	-0,82
-2,6	0,0075	At5g66400	RAB18 (RESPONSIVE TO ABA 18)	3,85
-2,54	0,01357143	At2g14247	Expressed protein	
-2,51	0,0234375	At5g04150	bHLH101	-3,41
-2,47	0,01266667	At5g50800	Nodulin MtN3 family protein	4,59
-2,43	0,0125	At2g37870	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	4,5
-2,42	0,01111111	At2g30766	Unknown protein	-0,27
-2,41	0,0105	At3g45860	Receptor-like protein kinase	-1,08
-2,41	0,015	At3g56275	Pseudogene of unknown protein	
-2,38	0,01703704	At1g67865	Unknown protein	0,21
-2,37	0,02419355	At1g53830	ATPME2 (Arabidopsis thaliana pectin methylesterase 2)	-0,043
-2,37	0,01181818	At5g59320	LTP3 (Lipid transfer protein 3)	4,85
-2,37	0,01176471	At5g10040	pseudogene of unknown protein	-0,25
-2,31	0,0126087	At1g14880	Similar to unknown protein	
-2,29	0,02333333	At1g12805	Nucleotide binding	
-2,27	0,02137931	At3g22231	PCC1 (Pathogen and circadian controlled 1)	0,086
-2,24	0,0168	At4g24000	AtCSLG2 (Cellulose synthase-like G2)	1,51
-2,23	0,023	At1g12030	Similar to unknown protein	-1,25
-2,2	0,02071429	At2g27550	ATC (Arabidopsis thaliana CENTRORADIALIS)	-0,26
-2,15	0,03536585	At3g22240	ARATH	0,78
-2,06	0,04285714	At1g76650	CML38; calcium ion binding	2,93
-2,06	0,03025641	At2g17850	Similar to unknown protein	-0,85
-1,97	0,04869565	At4g33560	Unknown protein	-1,16
22,36	0	At1g09250	bHLH149	-0,096
5,67	0	At3g44042	Transposable element gene	
3,07	0	At5g05340	Peroxidase	1,07
2,64	0,008	At5g14650	Polygalacturonase	-1,35
2,38	0,00666667	At5g44120	CRA1 (CRUCIFERINA); nutrient reservoir	1
2,33	0,00666667	At5g05350	similar to unknown protein	0,37
2,23	0,00714286	At5g54190	PORA (PROTOCHLOROPHYLLIDE REDUCTASE A)	0,24
2,19	0,0075	At1g48130	AtPER1 (1-CYSTEINE PEROXIREDOXIN 1)	1,81
2,11	0,00833333	At3g21370	Proteína de la familia GLYCOSYL HYDROLASE	1,17
2,09	0,029375	At4g12550	AIR1 (AUXIN-INDUCED IN ROOT CULTURES 1)	0,29

**Tabla 7** Representación de las variantes del motivo E en las regiones promotoras próximas (-500 pb desde el ATG) en los genes cuya transcripción varía en respuesta a la alteración en los niveles de expresión de *bHLH149*. Como referencia se indica la representación de estas variantes en la región promotora próxima de los genes representados en la micromatriz (Genoma, azul). En los genes inducidos (rosa) y en los genes reprimidos (verde) se indican los motivos observados (Obs), los motivos esperados (Esp) y la sobrerepresentación. La significación estadística de la sobrerepresentación entre los valores obtenidos y los esperados se indica como binomial. Los valores significativos se representan en rojo ( $p < 0,05$ ).

Motivos	Inducidos					Reprimidos			
	Genoma	Obs	Esp	Obs/Esp	Binomial	Obs	Esp	Obs/Esp	Binomial
CAAATG	0,492	4	4,427	0,904	0,605	16	17,216	0,929	0,648
CAATTG	0,156	2	1,407	1,421	0,411	3	5,472	0,548	0,910
CAAGTG	0,206	6	1,850	3,243	<b>0,012</b>	14	7,195	1,946	<b>0,016</b>
CAACTG	0,133	0	1,200	0,000	1,000	5	4,666	1,072	0,499
CATATG	0,148	2	1,336	1,498	0,386	8	5,194	1,540	0,154
CATGTG	0,242	2	2,177	0,919	0,634	17	8,466	2,008	<b>0,006</b>
CATCTG	0,128	1	1,150	0,870	0,683	7	4,471	1,566	0,165
CAGCTG	0,041	0	0,365	0,000	1,000	1	1,420	0,704	0,758
CAGGTG	0,062	1	0,560	1,785	0,429	3	2,179	1,377	0,372
CACGTG	0,123	1	1,108	0,902	0,670	13	4,311	3,016	<b>0,001</b>

Con el objetivo de estudiar la relación existente entre los resultados transcriptómicos obtenidos con el análisis transcriptómico global de la respuesta de las plantas a la carencia de Pi, se realizaron comparaciones entre los genes inducidos y reprimidos en la línea que sobreexpresaba *bHLH149* con los genes inducidos y reprimidos en la parte aérea de plantas cultivadas durante 7 días en medio completo y sin Pi (Bustos y col., 2010). Mediante dicho análisis se pudo observar la existencia de una correlación entre los genes reprimidos en respuesta a la alteración de los niveles de *bHLH149* respecto a los genes que se inducen durante la carencia de Pi (Tabla 8). El hecho de que la actividad de *bHLH149* se incrementa en el ayuno de Pi está de acuerdo con la disminución de crecimiento en dicha condición, por lo que parece que, en relación a los cambios transcriptómicos observados, el efecto de *bHLH149* es atenuar la respuesta a la carencia de Pi.

**Tabla 8** Comparación entre los genes inducidos y reprimidos en respuesta a la alteración de los niveles transcripcionales de *bHLH149* con los genes inducidos y reprimidos en la parte aérea durante el ayuno de Pi. La significación estadística se determinó mediante una prueba binomial ( $P < 0,001$ , valores resaltados en rojo).

	Inducidos -Pi vs inducidos	Inducidos -Pi vs reprimidos	Reprimidos -Pi vs reprimidos	Reprimidos -Pi vs inducidos
Obs (n° genes)	3	9	5	2
Esp (n° genes)	0,78	2,18	2,08	0,75
Binomial	0,0372	<b>0,0002</b>	0,0523	0,169

Como previamente se había observado un enriquecimiento estadísticamente significativo del motivo CAHGTG en los promotores de los genes reprimidos, se estudió el número total de motivos en todas sus variantes en la región promotora proximal (-500 pb desde el ATG) de los genes inducidos y reprimidos durante el ayuno de Pi. Respecto a los genes inducidos, se observó un enriquecimiento significativo de los motivos CACGTG, CAAGTG y CATATG (Tabla 9). En lo concerniente a los genes reprimidos durante el ayuno de Pi no se observaron diferencias significativas. (Tabla 9). Cabe destacar que la sobrerrepresentación de los motivos CAAGTG y CACGTG en los genes reprimidos en respuesta a la alteración en los niveles de *bHLH149* es mayor (1,9 y 3 veces respectivamente, Tabla 8) que el observado en los genes inducidos en el ayuno de Pi (Tabla 9). Este hecho pone de manifiesto la participación de *bHLH149* durante las respuestas a la deficiencia de Pi.

**Tabla 9** Representación de las variantes del motivo E en las regiones promotoras próximas (-500 pb desde el ATG) en los genes cuya transcripción varía durante el ayuno de Pi. Como referencia se indica la representación de estas variantes en la región promotora próxima de los genes representados en la micromatriz (Genoma, en azul). En los genes inducidos (rosa) y en los genes reprimidos (verde) se indican los motivos observados (Obs), los motivos esperados (Esp) y la sobrerrepresentación. La significación estadística de la sobrerrepresentación entre los valores obtenidos y los esperados se indica como binomial. Los valores significativos se representan en rojo ( $p < 0,05$ )

Motivos DNA	Inducidos					Reprimidos			
	Genoma	Obs	Esp	Obs/Esp	Binomial	Obs	Esp	Obs/Esp	Binomial
CAAATG	0,414	724	744,095	0,973	0,774	715	713,851	1,002	0,488
CAATTG	0,153	247	274,815	0,899	0,958	272	263,645	1,032	0,312
CAAGTG	0,205	422	368,586	1,145	<b>0,003</b>	367	353,604	1,038	0,245
CAACTG	0,135	226	242,419	0,932	0,862	198	232,565	0,851	0,991
CATATG	0,145	293	260,882	1,123	<b>0,027</b>	223	250,278	0,891	0,962
CATGTG	0,242	469	434,148	1,080	0,051	446	416,502	1,071	0,079
CATCTG	0,125	207	224,981	0,920	0,892	232	215,836	1,075	0,143
CAGCTG	0,041	84	74,367	1,130	0,145	61	71,344	0,855	0,903
CAGGTG	0,061	98	108,729	0,901	0,860	120	104,310	1,150	0,071
CACGTG	0,136	442	244,556	1,807	<b>0,000</b>	192	234,615	0,818	1,000



## **DISCUSIÓN**



La respuesta de las plantas frente a las fluctuaciones de Pi en el medio es un proceso complejo y altamente regulado. A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado una serie de sistemas adaptativos para hacer frente a las privaciones de Pi, que implican cambios a nivel de desarrollo, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Raghothama, 1999; Abel y col., 2002; Franco-Zorrilla y col., 2004; Ticconi y Abel, 2004; Rouached y col., 2010). En este trabajo se ha abordado la búsqueda de nuevos genes que intervengan en la regulación de la respuesta dependiente del estatus de Pi del medio en *Arabidopsis*. Para lograr este fin, se ha utilizado una estrategia basada en la búsqueda de proteínas que interaccionaran con un regulador clave de la respuesta, SPX1, utilizando la tecnología de los dos híbridos en levaduras. Los resultados obtenidos sugieren la participación de SPX1 en diversos procesos biológicos. Entre ellos, se encuentran los controlados por bHLH149, una proteína nuclear para la que se propone un papel clave en el control del crecimiento mediado por el nivel de Pi del medio.

## 1. MÚLTIPLES PROCESOS BIOLÓGICOS POTENCIALMENTE REGULADOS POR SPX1

La proteína SPX1 (Duan y col., 2008) posee el dominio SPX (SYG1, PHO81 y XPR1) presente en varias proteínas eucariotas implicadas en transducción de señal (Barabote y col., 2006). En plantas, se ha descrito que la mayor parte de las proteínas portadoras de este dominio participan en la adaptación medioambiental o en la regulación interna de la homeostasis mineral (Duan y col., 2008). Por ejemplo, se ha identificado el gen *IDS4* que se expresa en raíces de plantas de cebada cultivadas sin hierro (Nakanishi y col., 1993). Por su parte, el gen *NLA* es un regulador positivo de algunas de las respuestas adaptativas que se desarrollan en *Arabidopsis* durante el crecimiento a baja concentración de nitrógeno (Peng y col., 2007). En lo que respecta a la respuesta frente al ayuno de Pi, se ha descrito que la proteína PHO1 de *Arabidopsis* participa en los procesos de carga del macronutriente al xilema (Hamburger y col., 2002; Poirier y col., 1991) y algunas proteínas homólogas a PHO1 participarían en la carga de Pi al xilema y en la señalización del estatus de dicho nutriente (Wang y col., 2004). Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que *SPX1* y *SPX2* actúan

reprimiendo las respuestas al ayuno de Pi, probablemente a través de la inhibición de la unión de PHR1 al motivo P1BS (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultados sin publicar).

Con objeto de identificar nuevas proteínas reguladoras de las respuestas a la carencia de Pi se realizó un escrutinio de proteínas que interaccionaran con SPX1 mediante el sistema de los dos híbridos en levaduras. En el campo de la biología molecular de plantas esta estrategia se ha utilizado exitosamente para la detección de proteínas que interaccionan con fitocromos, criptocromos, factores de transcripción, proteínas integrantes del reloj circadiano y en la resistencia a patógenos (revisado en Causier y Davies, 2002; Kersten y col., 2002).

De todos los positivos obtenidos se seleccionaron aquellos que correspondían a las interacciones más fuertes (crecen en condiciones muy restrictivas en ensayos de complementación de auxotrofías y además poseen actividad  $\beta$ -galactosidasa). El estudio de la ontología de las proteínas que interaccionan con SPX1 sugiere su participación en una amplia gama de procesos biológicos, como la regulación de factores de transcripción, procesamiento del RNA, desarrollo embrionario, procesos de biosíntesis dependiente de ATP, además de regular o ser regulado por el proteosoma (Tabla 3). Se continuó con el estudio más detallado del gen *bHLH149*, por codificar una proteína implicada en la regulación de la transcripción, ser nuclear como la proteína SPX1 y pertenecer a la misma familia que el gen PHO4 de *S. cerevisiae* implicado en la activación del regulón PHO (revisado en Lenburg y O'Shea, 1996).

## **2. LA ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN *bHLH149* AFECTA AL CRECIMIENTO DE LA PLANTA**

Los datos obtenidos del análisis de plantas transgénicas que sobreexpresan *bHLH149* y con actividad disminuida del mismo gen apuntan a un papel de esta proteína en el control del crecimiento de la planta. Así, la sobreexpresión de *bHLH149* provoca una disminución en el crecimiento en la parte aérea y en la raíz (Figura 19 y 20), siendo estos fenotipos más acusados en estadíos adultos. No se observaron efectos singulares dependientes de la cantidad de Pi del medio al cultivar las líneas de sobreexpresión de *bHLH149*, a excepción de la reducción en el número de raíces laterales de las plantas cultivadas con Pi (Figura 20C). En este caso, la disminución de

tamaño de las plantas de estas líneas está asociada a una reducción del tamaño celular (Figura 21).

El efecto de la sobreexpresión de *bHLH149* sobre el crecimiento parece improbable que se deba a un artefacto causado por la desregulación de la maquinaria transcripcional, ya que los efectos observados en línea ox-*bHLH149* son opuestos a los observados en la línea RNAi-*bHLH149*. Así, si bien el tamaño global medido como biomasa de la línea con actividad disminuida de *bHLH149* no presenta diferencias significativas respecto al genotipo silvestre (Figura 37B), el tamaño celular es mayor (Figura 21). Además, la alteración en la expresión de *bHLH149* en el mutante *pho2* produce cambios en el tamaño de la planta. La sobreexpresión de *bHLH149* en dicho fondo genético presenta una disminución del tamaño de la planta incluso mayor que en fondo silvestre, mientras que en la línea de interferencia se observó el efecto contrario (Figura 37). Todos estos datos indican que el gen *bHLH149* regula de manera negativa el tamaño celular y el tamaño de la planta, aunque no existe una correlación estricta entre ambos parámetros, puesto que la disminución de la actividad de *bHLH149* en fondo genético silvestre sólo afecta al tamaño celular (Figura 21) y no al porte de la planta (Figura 37). Esta falta de correlación no es tan extraña ya que el tamaño de la planta viene determinado tanto por el número de células como por su tamaño (González y col., 2010). En consonancia con esta hipótesis, la sobreexpresión de *bHLH149* presenta un 50% más de células epidérmicas por unidad de superficie foliar, indicando una reducción en el tamaño de las células, mayor que el del porte de la planta (22%), por lo que el número de células es mayor. Además, la línea de interferencia de *bHLH149* presenta un 19% menos de células por superficie foliar y la misma masa que el genotipo silvestre (Figura 21).

Los datos disponibles hasta el momento sugieren que *bHLH149* controla positivamente la división celular. En este sentido, el estudio de los patrones de expresión durante el desarrollo indica que *bHLH149* se expresa en estadios tempranos del desarrollo foliar (Figura 11A) y más específicamente, los análisis histoquímicos han permitido delimitar la expresión de este gen en la base de las hojas jóvenes (Figura 11B) y en el ápice de la raíz, zonas con alta tasa de división celular (Figura 14B). *bHLH149* posee una alta tasa de transcripción en callos (Figura 11D) y además, se ha observado que los callos procedentes de las líneas que sobreexpresan *bHLH149* presentan un incremento en la tasa de proliferación celular respecto del genotipo silvestre (Figura

25A). Todos estos datos indican de nuevo la relación de *bHLH149* con los procesos de proliferación celular.

### **3. POSIBLE PAPEL DE *bHLH149* EN LA SEÑALIZACIÓN HORMONAL**

Las plantas a lo largo de la evolución han desarrollado una compleja red de regulación que integra la progresión del ciclo celular, el crecimiento y el desarrollo en respuesta a los estímulos internos y medioambientales (Gutiérrez y col., 2002). El control de la proliferación celular y la diferenciación durante el desarrollo depende, en la mayoría de los casos, de la acción coordinada de las hormonas vegetales (Ramírez-Parra y col., 2005). Los datos obtenidos del estudio de *bHLH149* indican su participación en las rutas de señalización de varias de estas hormonas, tales como citoquininas, giberelinas y brasinoesteroides.

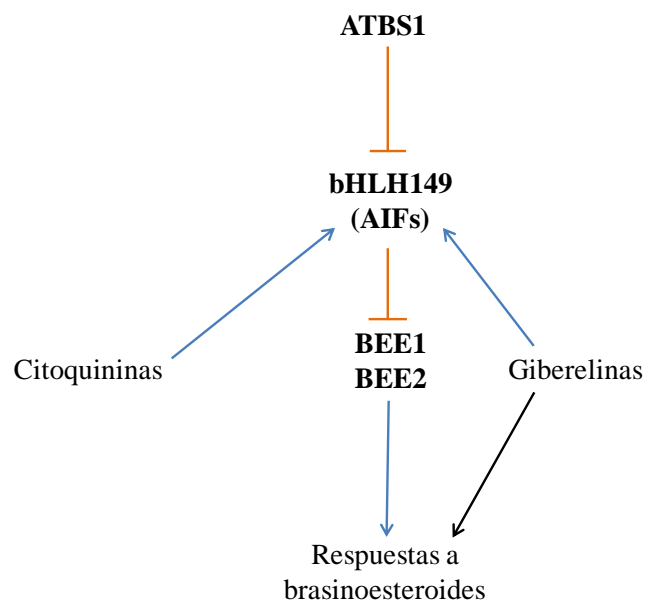
Las citoquininas son hormonas que participan en diversos procesos como división celular, la morfogénesis de hojas y raíces, la maduración de los cloroplastos, la expansión celular y prevención de la senescencia (Taiz y Zeiguer, 2006). Además, participan en las respuestas frente a la carencia de Pi ya que la adición exógena de estas hormonas reprime la transcripción de la mayoría de los genes que se inducen durante la carencia de Pi en la raíz (Martín y col., 2000; Franco-Zorrilla y col., 2002 y 2005). La implicación de *bHLH149* en la ruta de señalización por citoquininas está apoyada por el hecho de que su transcripción se induce en respuesta a la aplicación de dicha hormona (Figura 14A). Además, la sobreexpresión de *bHLH149* provoca que los callos sean más grandes y más verdes (Figura 25A), efecto reminiscente de la actividad de esta hormona al igual que el adelanto en la senescencia tanto de los callos de las líneas RNAi-*bHLH149* cultivados sin aporte hormonal (Figura 25B) como en las hojas escindidas (Figura 24).

Las giberelinas son hormonas implicadas en diversos procesos fisiológicos como la germinación de las semillas, el crecimiento de la raíz, la elongación del hipocotilo, la expansión de las hojas e iniciación del desarrollo floral (Hooley, 1994 y Richards y col., 2001). Cuando las plantas se cultivan en medios con bajas concentraciones de Pi se produce una disminución en los niveles de giberelinas activas, que se correlaciona con un incremento en la acumulación de la proteína RGA que modula, entre otras respuestas, la acumulación de antocianinas y el crecimiento de pelos radiculares (Jiang y col., 2007). La implicación de *bHLH149* en la ruta de señalización por giberelinas está

sugerida por el hecho de la que transcripción del gen se induce en los hipocotilos y en los haces vasculares de los cotiledones en respuesta a estas hormonas (Figura 14B). Además, las líneas RNAi-bHLH149 mostraron una mayor sensibilidad a la hormona en el ensayo de crecimiento de hipocotilos (Figura 26). Este resultado apunta a un papel de *bHLH149* como represor de la actividad de la giberelinas.

Los brasinoesteroides son hormonas implicadas en diversos procesos tales como la expansión celular y la diferenciación del xilema (Friedrichsen y col., 2002). Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio indican que cuando las plantas se cultivan en medios sin Pi se produce un aumento en la acumulación de la isoforma fosforilada de la proteína BES1 (inactiva), indicando que durante el ayuno de Pi la ruta de señalización mediada por brasinoesteroides se encuentra reprimida (M.I. Puga y J Paz-Ares, resultados sin publicar). El papel de *bHLH149* en relación a su participación en la ruta de señalización de brasinoesteroides es el mejor establecido. En este sentido bHLH149 y otras tres proteínas homólogas (subfamilia AIF; ATBS1 INTERACTING FACTOR) interaccionan tanto en levaduras como funcionalmente con la proteína ATBS1, regulador positivo de la señalización en respuesta a brasinoesteroides (Wang y col., 2009). Se postula que el modo de actuación a través del cual ATBS1 ejerce esta regulación consiste en el secuestro de componentes negativos de la ruta tales como las proteína AIF (Wang y col., 2009). El hecho de que las cuatro proteínas AIF interaccionen con ATBS1 indicaría que tienen funciones redundantes, si bien esta posibilidad no se ha analizado en detalle. Además la sobreexpresión de *ATBS1* aumenta el tamaño celular en el fondo genético *bri1-301* (Wang y col., 2009), indicando una relación entre el control de la división/elongación celular y la ruta de señalización por brasinoesteroides. Asimismo, nuestros resultados en estudios de levaduras han mostrado que bHLH149 interacciona en levaduras con las proteína BEE1 y BEE2 (BRASINOESTEROID ENHANCED EXPRESSION, Friedrichsen y col., 2002) (Tabla 5), al igual que AIF1 (Wang y col., 2009). *BEE1* y *BEE2* codifican proteínas pertenecientes a la familia bHLH con capacidad de unión a DNA, y su expresión se induce en respuesta a la adición de la hormona (Friedrichsen y col., 2002). Además, el triple mutante *bee1*, *bee2*, *bee3* se caracteriza por el reducido tamaño de algunos de sus órganos, como el hipocotilo y el gineceo, como ocurre en las plantas que sobreexpresan *bHLH149* (Figura 26). Por el contrario, la expresión constitutiva de *BEE1* provoca el efecto opuesto respecto al tamaño del gineceo (Friedrichsen y col., 2002). Además, los brasinoesteroides controlan la proliferación celular en las hojas (Nakaya y col., 2002).

Con todo lo expuesto anteriormente, el modelo que proponemos es que *bHLH149* podría actuar como represor de la señalización por brasinoesteroides inhibiendo la unión de BEE1 y BEE2 al DNA. A su vez, la actividad de *bHLH149* está regulada negativamente por *ATBS1*. El efecto inhibitor de *bHLH149* sobre las rutas de señalización por brasinoesteroides y por giberelinas está en línea con la bien establecida interacción de ambas rutas. Por ejemplo la aplicación exógena de brasinoesteroides a plantas de *Arabidopsis* revierte los defectos de la germinación de mutantes insensibles o defectivos de la síntesis de giberelinas (Steber y McCourt, 2001). Con todo lo expuesto anteriormente, *bHLH149* podría representar un elemento de conexión entre ambas rutas de señalización hormonal (Figura 40).



**Figura 40** Modelo propuesto del papel de *bHLH149* en la señalización hormonal. Con las líneas naranjas se muestra la regulación a nivel de proteína y con las líneas azules se representa la regulación a nivel transcripcional.

#### 4. PAPEL DE *bHLH149* EN EL CONTROL DE LA SENESCENCIA

La senescencia foliar es un proceso degenerativo que constituye la etapa final del desarrollo de las hojas. Este proceso está determinado por factores intrínsecos, como las hormonas y la reproducción, y factores medioambientales tanto bióticos como abióticos (Lim y col., 2007). Los resultados obtenidos respecto a la participación de *bHLH149* no son del todo congruentes desde una perspectiva simple. Por una parte, las líneas RNAi-*bHLH149* mostraron un adelanto en la senescencia en cotiledones al



cultivarse en medio carente de Pi (Figura 19A) y en los callos al eliminar el aporte hormonal (Figura 24B), así como en hojas jóvenes escindidas e incubadas en agua y oscuridad (Figura 24). Estos datos estarían en consonancia con un papel de *bHLH149* en la prevención de la senescencia inducida por estrés.

Por otra parte, la alteración en la expresión de *bHLH149* en fondo mutante *pho2* provoca en las plantas efectos diferentes a los observados en el genotipo silvestre. El gen *PHO2* se expresa en hojas senescentes y tras tratamientos que inducen la senescencia como el ayuno de nitrógeno y la noche prolongada (Bari y col., 2006). Además, el mutante *pho2* posee una aceleración de la senescencia debido a que no es capaz de movilizar el nutriente de las hojas viejas a las jóvenes y se produce un exceso de Pi (Chiou y col., 2006; Aung y col., 2006; Delhaize y Randall, 1995). La disminución de la actividad de *bHLH149* en fondo genético *pho2* recupera el fenotipo silvestre en lo que se refiere a senescencia/muerte celular (Figura 38A y B), mientras que la sobreexpresión de *bHLH149* exacerba dicho fenotipo (Figura 38C y D). Aunque no se dispone de una explicación definitiva para esta aparente contradicción, hay que resaltar que la aceleración de la senescencia/muerte celular en el mutante *pho2* puede implicar un programa genético distinto del inhibido por *bHLH149*, y por tanto la alteración de la actividad de dicho gen en el fondo genético *pho2* puede dar lugar a un resultado opuesto al que ocurre en el genotipo silvestre. Un paralelismo en este sentido es el efecto que ejercen las hormonas en función del órgano donde estén actuando. En el caso de las citoquininas, en la parte aérea estimulan la ramificación y en la raíz inhiben el crecimiento (Taiz y Zeiger, 2006).

## 5. MECANISMO DE ACCIÓN E INTEGRACIÓN DE *bHLH149* EN LA RUTA DE AYUNO DE Pi

La proteína bHLH149 es una proteína nuclear cuya localización subcelular no varía en función del estatus de Pi en el que se hayan cultivado las plantas (Figura 15), al igual de lo que ocurre con otras proteínas implicadas en la homeostasis del Pi tales como PHR1 (Rubio y col., 2001), bHLH32 (Chen y col., 2007), WRKY75 (Devaih y col., 2007) y ZAT6 (Devaih y col., 2009). Aunque su localización subcelular no varía en función del estatus de Pi, la proteína HA-bHLH149 se acumula más en plantas cultivadas sin Pi (Figura 34).

Los análisis de la secuencia aminoacídica indican que esta proteína posee un número bajo de aminoácidos básicos en su dominio básico además de carecer de los residuos E13/K16, críticos para la unión con el DNA (Toledo-Ortiz y col., 2003). Los estudios de interacción proteína-DNA realizados en este trabajo indican que la proteína bHLH149 no une a DNA (Figura 10), confirmando esta hipótesis. En los últimos años se han caracterizado cuatro proteínas, KIDARI (Hyun y Lee, 2006), PAR1 y PAR2 (Bou-Torrent y col., 2008) y AIF1 (Wang y col., 2009), pertenecientes a la subfamilia de bHLH149 sin capacidad de unión a DNA que actúan como represores de diversos procesos biológicos, probablemente a través de la formación de heterodímeros con otros bHLH con capacidad de unión a DNA (Massari y Murre, 2000), de manera similar a las proteínas Id1 de humanos (Norton, 2000) y EMC de *Drosophila melanogaster* (Campuzano, 2001). Además, los resultados sobre ATBS1 muestran que este tipo de proteínas podrían interferir su función entre sí (Wang y col., 2009).

En lo que respecta a *bHLH149*, como se ha discutido anteriormente, las proteínas BEE1 y BEE2 serían dos posibles candidatos para formar heterodímeros con bHLH149 ya que interaccionan en el sistema de los dos híbridos y la expresión ectópica de *bHLH149* y de *BEE1* poseen efectos fenotípicos opuestos. Dada la interacción de la proteína bHLH149 con componentes de la ruta de respuesta frente a la carencia de Pi, otro posible candidato a ser controlado por *bHLH149* sería la proteína bHLH32 (Chen y col., 2007). La proteína bHLH32 actúa como represora de algunas de las respuestas que se desarrollan durante el ayuno de Pi como son la proliferación de pelos radiculares y la acumulación de antocianinas (Chen y col., 2007). Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo indican que *bHLH149* no regula a *bHLH32*, ya que la proliferación de pelos radiculares y la acumulación de antocianinas en respuesta al ayuno de Pi no están alteradas en las líneas ox-bHLH149 y RNAi-bHLH149, indicando que no existe interacción genética entre ambas proteínas. Además, no se observó interacción de ambas proteínas en el ensayo de los dos híbridos en levaduras (Tabla 5).

El papel de *bHLH149* como inhibidor de otros bHLHs que unen a DNA está avalado por los resultados de los análisis transcriptómicos de plantas con los niveles de *bHLH149* alterados. Así se han identificado 43 genes, de los cuales 34 de ellos están regulados negativamente y 9 positivamente en respuesta a la alteración de la actividad de *bHLH149* (Tabla 6). Los genes regulados negativamente presentan en sus promotores un enriquecimiento en el motivo CAHGTG reconocido por proteínas bHLH con capacidad de unión a DNA, lo que apoyaría esta hipótesis. Cabe resaltar que el

conjunto de genes cuya transcripción disminuye en respuesta a la alteración de los niveles de *bHLH149* está enriquecido en genes que se inducen durante la carencia de Pi (Tabla 8), lo que apuntaría a un papel de *bHLH149* como atenuador de algunas de las respuestas que se producen durante el ayuno de dicho nutriente.

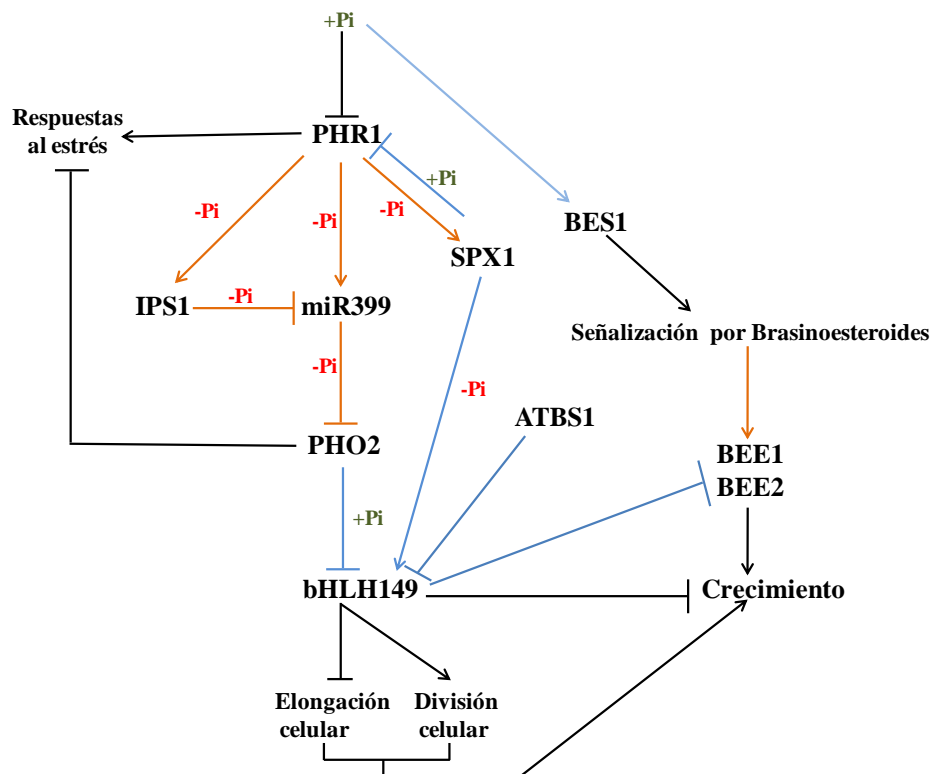
En lo que respecta al papel fisiológico de bHLH149, los resultados obtenidos en este trabajo indican que no participa en procesos tales como la acumulación de antocianinas en respuesta al estrés o la homeostasis de Pi (Figura 31 y 36), centrándose su participación en el control del crecimiento dependiente de Pi. El hecho de que los resultados transcriptómicos no reflejen alteraciones significativas en los niveles de transcripción de genes implicados en la división/elongación celular puede deberse a que dichos procesos ocurren en un bajo número de células, lo que contribuye a diluir los resultados (Beemster y col., 2005). La participación del gen *bHLH149* en la respuesta al ayuno de Pi está avalada por los efectos fenotípicos provocados por la alteración en los niveles de expresión de *bHLH149* y la interacción tanto con SPX1 como con PHO2.

En relación a la interacción de bHLH149 y SPX1 hay que resaltar que es mayor cuando los niveles de Pi en la planta son bajos (Figura 34), al contrario de lo que ocurre con la interacción de SPX1 y PHR1, que es mayor cuando los niveles de Pi de la planta son altos (M.I. Puga y J. Paz-Ares). Al cultivar las plantas que sobreexpresan *SPX1* y *bHLH149* en medios con baja concentración de Pi se observa que se produce una disminución en la biomasa (Figura 33A) y ésta va acompañada de un aumento en la acumulación de bHLH149, por lo que SPX1 podría estar implicado en la acumulación de la proteína bHLH149 en las plantas cultivadas en baja concentración de Pi (Figura 33).

En lo que respecta a la interacción bHLH149 y PHO2, los resultados obtenidos a nivel molecular son congruentes con los datos obtenidos del análisis fenotípico de las líneas ox-bHLH149 y RNAi-bHLH149 en fondo mutante *pho2* (Figura 37), de los que se deduce que ambos genes participan de manera antagonista en el crecimiento. Además, los datos moleculares indican que PHO2 regula negativamente la acumulación de bHLH149 (Figura 39B), resultado de interés ya que es la primera vez que se obtienen evidencias del posible papel de PHO2 como modulador negativo de la acumulación de proteínas en la respuesta a Pi.

De acuerdo con los datos obtenidos en esta tesis junto con los disponibles en la bibliografía, se propone el siguiente modelo de actuación de *bHLH149* en relación al estatus de Pi del medio. Cuando una planta adulta crece en un medio con Pi, SPX1 se

une a PHR1, inhibiendo su actividad (M.I. Puga y J. Paz-Ares, resultados sin publicar). En estas condiciones, la proteína PHO2 regula negativamente los niveles de acumulación de bHLH149 y se produce el crecimiento normal de la planta. Una vez que comienza la situación de ayuno, se produce un incremento en la transcripción de miR399 inducida por PHR1, y el miR399 dirige el corte del transcrito de PHO2 (Aung y col., 2006; Bari y col., 2006; Franco-Zorilla y col., 2007). Al disminuir los niveles de proteína PHO2 se produce un aumento en la acumulación de la proteína bHLH149, que se traduce en una disminución de la producción de biomasa. Por otro lado, durante el ayuno se produce un aumento en la transcripción del gen *SPX1* (Franco-Zorilla y col., 2005), cuya proteína se une de manera más eficiente a la proteína bHLH149. A su vez, SPX1 regula de manera positiva la acumulación de bHLH149, que provoca una parada en la producción de biomasa, ejerciendo su efecto probablemente a través de la represión de la ruta de señalización por brasinoesteroides a través de heterodimerización con BEE1 y BEE2. En resumen, bHLH149 estaría controlando la producción de biomasa dependiente de la cantidad de Pi del medio, ejerciendo su efecto a través de la ruta de señalización de los brasinoesteroides. El control de la actividad de bHLH149 dependiente de Pi se llevaría a cabo por SPX1 y PHO2.



**Figura 41** Modelo de la ruta de señalización del ayuno de Pi. En este modelo se propone que bHLH149 controla el crecimiento dependiente de la cantidad de Pi del medio. Con las líneas de color azul se representa las interacciones proteína/proteína y con las líneas naranjas la regulación transcripcional.

## **CONCLUSIONES**



1. La identificación de proteínas que interaccionan con SPX1 sugiere su participación en una amplia gama de procesos biológicos tales como la regulación de factores de transcripción, procesamiento del RNA, desarrollo embrionario, procesos de biosíntesis dependiente de ATP además de regular o ser regulado por el proteosoma.
2. SPX1 interacciona físicamente tanto *in vitro* como *in vivo* con bHLH149, una proteína bHLH atípica que no une a DNA. Esta interacción depende del dominio SPX.
3. El gen *bHLH149* se expresa en estadios tempranos del desarrollo foliar y en zonas con alta tasa de división celular. La sobreexpresión de *bHLH149* provoca un incremento en la tasa de proliferación celular en callos, lo que apunta que *bHLH149* regula positivamente dicho proceso. Por otra parte, los análisis fenotípicos de plantas transgénicas con la expresión alterada de *bHLH149* indican que dicho gen controla negativamente la elongación celular. El efecto neto sobre división/elongación celular es generalmente una reducción en la acumulación de la biomasa.
4. El gen *bHLH149* participa en la prevención de la senescencia inducida por estrés. Los fenotipos de senescencia/muerte celular observados en las líneas ox-bHLH149 y RNAi-bHLH149 en fondo mutante *pho2* apuntan a que el programa de senescencia/muerte celular controlado por PHO2 es distinto del inhibido por *bHLH149*.
5. El gen *bHLH149* puede representar un importante nodo en el contexto de las rutas de señalización de varias hormonas. Así, *bHLH149* se induce por citoquininas y por giberelinas y tiene un efecto represor sobre la ruta de transducción de la señal de los brasinoesteroides.
6. A nivel molecular, *bHLH149* probablemente actúa interfiriendo con la capacidad de unión a DNA de proteínas de la familia bHLH tales como BEE1 y BEE2, con las que interacciona en el sistema de dos híbridos en levaduras.
7. El papel de bHLH149 como inhibidor de otros bHLH con capacidad de unión a DNA está avalado por los resultados transcriptómicos obtenidos mediante micromatrices. El análisis de las secuencias promotoras proximales de los genes que se reprimen en respuesta a la alteración en los niveles de *bHLH149* indica un enriquecimiento en la

presencia del motivo CAHGTG, secuencia reconocida por las proteínas bHLH con capacidad de unión a DNA. Además, los genes cuya transcripción disminuye en respuesta a la alteración de la actividad de *bHLH149* están enriquecidos en genes que se inducen durante la carencia de Pi, lo que apuntaría a un papel de este gen como atemperador de algunas de las respuestas que se producen durante el ayuno de Pi.

**8.** La proteína bHLH149 interacciona no solamente con SPX1 sino también con PHO2, un gen clave en el control de la homeostasis del Pi, en el sistema de dos híbridos en levaduras así como (semi) *in planta*.

**9.** La interacción de bHLH149 con SPX1 es negativamente dependiente del nivel de Pi de la planta y los análisis presentados en este trabajo sugieren que SPX1 regula positivamente la acumulación de la proteína bHLH149.

**10.** La interacción de PHO2 con bHLH149 tiene como consecuencia la disminución en la estabilidad de ésta, lo cual es consistente con el papel esperado para PHO2 en la ruta de degradación de proteínas mediada por el proteosoma.

**11.** Los experimentos presentados en esta memoria indican que el gen *bHLH149* regula el crecimiento de la planta dependiente de la cantidad de Pi del medio a través de la interacción con SPX1 y PHO2, ejerciendo este control a través de la ruta de señalización de los brasinoesteroides.



## **BIBLIOGRAFÍA**



**Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K.** (2003) *Arabidopsis AtMYC2* (bHLH) and *AtMYB2* (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*. **1**, 63-78.

**Abel S., Ticconi C. A. y Delatorre C. A.** (2002) Phosphate sensing in higher plants. *Physio. Plant.* **115**, 1-8.

**Adalsteinsson S. y Jensen P.** (1990) Influence of temperature on root development and phosphate influx in winter wheat growth at different P levels. *Physiol. Plantarum*. **80**, 69-74.

**Ames B. N.** (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzimol.* **8**, 115-18.

**An G., Ebert P. R., Mitra A. y Ha S. B.** (1988) Direct *Agrobacterium* transformation: freeze-thaw method. *Plant Molecular Biology Manual*, 1-19.

**Arnon D. I.** (1948) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1-15.

**Aung K., Lin S. I., Wu C. C., Huang Y. T., Su C. L., Chiou T. J.** (2006) *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol.* **3**, 1000-11.

**Barabote R. D., Tamang D. G., Abeywardena S. N., Fallah N. S., Fu J. Y., Lio J. K., Mirhosseini P., Pezeshk R., Podell S., Salampessy M. L., Thever M. D., Saier M. H. Jr.** (2006) Extra domains in secondary transport carriers and channel proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. **10**, 1557-79.

**Barber S. A., Walker J. M. y Vasey E. H.** (1963) Mechanisms for the movement of plants nutrients from the soil and fertilizer to the plant root. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **11**, 204-07.

**Bari R., Datt Pant B., Stitt M. y Scheible W. R.** (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* **3**, 988-99.

**Bariola P.A., Howard C.J., Taylor C.B., Verburg M.T., Jaglan V.D. y Green P.J.** (1994) The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J.* **6**, 673-85.

**Bartel D.P.** (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. **2**, 281-97.

**Bartel D.P.** (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. **2**, 215-33.

**Bates T. R. y Lynch J. P.** (1996) Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorous availability. *Plant Cell Environ.* **19**, 529-38.

**Bauer P., Ling H. Q., Guerinot M. L.** (2007) *FIT*, the FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **5**, 260-10.

**Benjamini Y. y Hochberg Y.** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B.* **57**, 289-300.

**Bialeski R. L.** (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* **24**, 225-52.

**Bolstad, B. M., Irizarry R. A., Astrand, M. y Speed, T. P.** (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. *Bioinformatics.* **19**, 185-193.

**Boter M., Ruíz-Rivero O., Abdeen A., Prat S.** (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **13**, 1577-91.

**Bou-Torrent J., Roig-Villanova I., Galstyan A. y Martínez-García J. F.** (2008) *PAR1* and *PAR2* integrate shade and hormone transcriptional networks. *Plant Sign. and Behav.* **7**, 453-54.

**Bradford M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-54.

**Brady S. M., Orlando D. A., Lee J. Y., Wang J. Y., Koch J., Dinneny J. R., Mace D., Ohler U., Benfey P. N.** (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science.* **585**, 801-6.

**Breemster T.G., De Veylder L., Vercruyse S., West G., Rombaut D., Van Hummelen, Galichet A., Gruissem W. Y Inzé D.** (2005) Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transition in growing organs of *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* **138**, 735-743.

**Breitling R., Armengaud P., Amtmann A., Herzyk P.** (2004) Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett.* **573**, 83-92.

**Bryce J. H., Azcon-Bieto J., Wiskich J. T. y Day D. A.** (1990) Adenylate control of respiration in plants: the contribution of rotenone insensitive electron

transport to ADP-limited oxygen consumption by soybean mitochondria. *Physiol. Plant.* **78**, 105-11.

**Brumbarova T. y Bauer P.** (2005) Iron-mediated control of the basic helix-loop-helix protein FER, a regulator of iron uptake in tomato. *Plant Physiol.* **137**, 1018-26.

**Bucher M.** (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol.* **173**, 11-26.

**Burleigh S. H. y Harrison M. J.** (1998) Characterization of the *Mt4* gene from *Medicago truncatula*. *Gene* **216**: 47-53.

**Burleigh S. H. y Harrison M. J.** (1999) The down-regulation of *Mt4*-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant Physiol.* **119**, 241-48.

**Bustos R., Castrillo G., Linhares F., Puga M.I., Rubio V., Pérez-Pérez J., Solano R., Leyva A y Paz-Ares J.** (2010) A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plos Gen.* in press

**Calderon-Vazquez C., Ibarra-Laclette E., Caballero-Perez J. y Herrera-Estrella L.** (2008) Transcript profiling of *Zea mays* roots reveals gene responses to phosphate deficiency at the plant- and species-specific levels. *J Exp Bot.* **9**, 2479-97.

**Campuzano S.** (2001) Emc, a negative HLH regulator with multiple functions in *Drosophila* development. *Oncogene.* **58**, 8299-307.

**Carey M. y Smale S. T.** (2000) Transcriptional regulation in eukaryotes: concepts, strategies and techniques. *Cold Spring Harbour Laboratory Press.*

**Catarecha P., Segura M. D., Franco-Zorrilla J. M., García-Ponce B., Lanza M., Solano R., Paz-Ares J. y Leyva A.** (2007) A mutant of the *Arabidopsis* phosphate transporter *PHT1;1* displays enhanced arsenic accumulation. *Plant Cell.* **19**, 1123-33.

**Causier B. Y Davies B.** (2002) Analysis protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Mol. Biol.* **50**, 855-70.

**Chen Y. F., Li L. Q., Xu Q., Kong Y. H., Wang H. Y Wu W. H.** (2009) The *WRKY6* transcription factor modulates *PHOSPHATE1* expression in response to low Pi stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **21**, 3554-66.

**Chen Z. H., Nimmo G. A., Jenkins G. I. y Nimmo H. G.** (2007) *BHLH32* modulates several biochemical and morphological processes that respond to Pi starvation in *Arabidopsis*. *Biochem J.* **1**, 191-8.

**Chiou T. J., Liu H. y Harrison M. J.** (2001) The spatial expression patterns of a phosphate transporter (*MtPT1*) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. *Plant J.* **25**, 281-93.

**Chiou T. J., Aung K., Lin S. I., Wu C. C., Chiang S. F. y Su C. L.** (2006) Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **2**, 412-21.

**Church G. M. y Gilbert W.** (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 1991-95.

**Ciftci-Yilmaz S. y Mittler R.** (2008) The zinc finger network of plants. *Cell Mol. Life Sci.* **7-8**, 1150-60.

**Clough S. J. y Bent A. F.** (1995) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **6**, 735-43.

**Comerford N.B.** (1998) Soil phosphorus bioavailability. In: Lynch J. P. Deikman J., Eds. Phosphorus in plant biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes. Rockville, M. D., USA: American Society of Plant Physiology, 136-147.

**Cruz-Ramírez A., Oropeza-Aburto A., Razo-Hernández F., Ramírez-Chávez E. y Herrera-Estrella L.** (2006) Phospholipase *DZ2* plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci USA.* **17**, 6765-70.

**Daram P., Brunner S., Persson B. L., Amrhein N. y Bucher M.** (1998) Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta.* **206**, 225-33.

**Daxinger L., Hunter M., Jauvion V., Gascioli V., Vaucheret H., Matzke M. y Furner I.** (2007) Unexpected silencing effects from T-DNA tags in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **13**, 4-6.

**Delhaize E. y Randall P. J.** (1995) Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **1**, 207-13.

**Devaiah B. N., Karthikeyan A. S. y Raghothama K. G.** (2007a) WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **4**, 1789-801.

**Devaiah B. N., Nagarajan V. K. y Raghothama K. G.** (2007b) Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiol.* **1**, 147-59.

**Devaiah B. N., Madhuvanthi R., Karthikeyan A. S. y Raghothama K. G.** (2009) Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in *Arabidopsis*. *Mol. Plant.* **2**, 43-58.

**Doerner P.** (2008) Phosphate starvation signaling: a threesome controls systemic P(i) homeostasis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 536-40.

**Dong J., Chen C. y Chen Z.** (2003) Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol.* **51**, 21-37.

**Doyle J. J. y Doyle J. L.** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.

**Duan K., Yi K., Dang L., Huang H., Wu W. y Wu P.** (2008) Characterization of a sub-family of *Arabidopsis* genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. *Plant J.* **54**, 965-75.

**Duek P.D. y Fankhauser C.** (2003) HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. *Plant J.* **6**, 827-36.

**Duff S. M., Moorhead G. B., Lefevre D. D. y Plaxton W. C.** (1989) Phosphate starvation inducible "bypasses" of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol.* **90**, 1275-78.

**English J. J., Mueller E. y Baulcombe D. C.** (1997) The influence of small changes in transgene transcription on homology-dependent virus resistance and gene silencing. *Plant J.* **12**, 1311-1318.

**Essigmann B., Guler S., Narang R. A., Linke D. y Benning C.** (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQD1*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**, 1950-55.

**Eulgem T., Rushton P. J., Robatzek S. y Somssich I. E.** (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**, 199-206.

**Fairman R., Beran-Steed R. K., Anthony-Cahill S. J., Lear J. D., Strafford, W. F. DeGrado W. F., Benfield P. A. y Brenner S. L.** (1993). Multiple oligomeric states regulate the DNA binding of helix-loop-helix peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 10429-33.

**Franco-Zorrilla J. M., Martín A. C., Solano R., Rubio V., Leyva A. y Paz-Ares J.** (2002) Mutations at *CRE1* impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**, 353-60.

**Franco-Zorrilla J. M., Gonzalez E., Bustos R., Linhares F., Leyva A. y Paz-Ares J.** (2004) The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J. Exp Bot.* **55**, 285-93.

**Franco-Zorrilla J. M., Martín A. C., Leyva A. y Paz-Ares J.** (2005) Interaction between Phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors *CRE1/AHK4* y *AHK3*. *Plant Physio.* **138**, 847-57.

**Franco-Zorrilla J. M. Valli A., Todesco M. Mateos I., Puga M. I., Rubio-Somoza I., Leyva A., Weigel D., García J.A. y Paz-Ares J.** (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat. Genet.* **39**, 1033-37.

**Fredeen A. L., Raab T. K., Rao I. M. y Terry N.** (1990) Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in *Glycine max* L. Merr. *Planta.* **181**, 399-405.

**Friedrichsen D. M., Nemhauser J., Muramitsu T., Maloof J. N., Alonso J., Ecker J. R., Furuya M. y Chory J.** (2002) Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics.* **3**, 1445-56.

**Fujii H., Chiou T. J., Lin S. I., Aung K. Y Zhu J. K.** (2005) A miR399 involved in phosphate-starvation in *Arabidopsis*. *Current Biology.* **15**, 2038-43.

**Gao Y., Gong X., Cao W., Zhao J., Fu L., Wang X., Schumaker K. S. y Guo Y.** (2008) *SAD2* in *Arabidopsis* functions in trichome initiation through mediating *GL3* function and regulating *GL1*, *TTG1* and *GL2* expression. *J. Integr. Plant Biol.* **7**, 906-17.

**Gietz R. D. y Woods R. A** (2002) Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/ PEG method. *Method in enzymology.* **350**, 87-96.

**Gilbert N.** (2009) The disappearing nutrient. *Nature.* **461**, 716-18.

**González E, Solano R, Rubio V, Leyva A y Paz-Ares J.** (2005) PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **17**, 3500-12.



**Gonzalez N., De Bodt S., Sulpice R., Jimuru Y., Chae E., Dhonst S., Van Daele T., De Milde L., Weigel D., Kamiya Y., Stitt M., Breemster G. T. S. Y Inzé D.** (2010) Increases leaf size: difference means to an end. *Plant Physiol.* DOI:10.1104

**Gutiérrez C.** (2005) Coupling cell proliferation and development in plants. *Nat. Cell Biol.* **7**, 535-39

**Gutiérrez C. , Ramirez-Parra E., Castellano M. M y del Pozo J. C.** (2002) G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 480-6.

**Hamburger D., Rezzonico E., MacDonal-Combert Petétot J., Somerville C. y Poirier Y.** (2002) Identification and characterization of the *Arabidopsis PHO1* gene involved in phosphate loading to the xylem. *The Plant Cell.* **14**, 889-902.

**Hammond J. P., Bennett M. J., Bowen H. C., Broadley M. R., Eastwood D. C., May S. T., Rahn C., Swarup R., Woolaway K. E. y White P. J.** (2003) Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol.* **132**, 578-96.

**Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K y Elledge S.J.** (1993) The p21 Cdk-interacting protein Clip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* **75**, 805-16.

**Harrison M. J.** (1999) Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **50**, 361-89.

**Heim M. A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B. y Bailey P. C.** (2003) The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* **5**, 735-47.

**Heisler M. G., Atkinson A., Bylstra Y. H., Walsh R. y Smyth D. R.** (2001) SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development.* **7**, 1089-98.

**Hilson P., Allemeersch J., Altmann T., Aubourg S., Avon A., Beynon J., Bhalerao R. P., Bitton F., Caboche M., Cannoot B., Chardakov V., Cognet-Holliger C., Colot V., Crowe M., Darimont C., Durinck S., Eickhoff H., de Longevialle A. F., Farmer E. E., Grant M., Kuiper M. T., Lehrach H., Léon C., Leyva A., Lundeberg J., Lurin C., Moreau Y., Nietfeld W., Paz-Ares J., Reymond P., Rouzé P., Sandberg G., Segura M. D., Serizet C., Tabrett A., Taconnat L., Thareau V., Van Hummelen P., Vercruysse S., Vuylsteke M., Weingartner M., Weisbeek P. J., Wirta V., Wittink F. R., Zabeau M., y Small I.** (2004) Versatile

gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Res.* **14**, 2176-89.

**Hinsinger P.** (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant soil.* **237**, 173-95.

**Hirsch J., Marin E., Floriani M., Chiarenza S., Richaud P., Nussaume L., Thibaud M. C.** (2006) Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in *Arabidopsis* plants. *Biochimie.* **11**, 1767-71.

**Hoffman C.S. y Winston F.** (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* **57**, 267-72.

**Holford I. C. R.** (1997) Soil phosphorus: its measurement and its uptake by plants. *Austr. J. Soil Res.* **35**, 227-39.

**Hooley R.** (1994) Gibberelins: perception, transduction and responses. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1529-55.

**Horgan J. M. y Wareing P. F.** (1980) Cytokinins and the growth responses of seedlings of *Betula pendula* Roth. and *Acer pseudoplatanus* L. to nitrogen and phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Botany.* **31**, 525-32.

**Hsieh L. C., Lin S. I., Shih A. C., Chen J. W., Lin W. Y., Tseng C. Y., Li W. H., Chiou T. J.** (2009) Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol.* **4**, 2120-32.

**Hulett F.M.** (1996) The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **5**, 933-9.

**Hyun Y. y Lee I.** (2006) KIDARI, encoding a non-DNA binding bHLH protein, represses light signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **61**, 283-96.

**James P., Halladay J. y Craig E. A.** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* **144**, 1425-36.

**Jefferson R. A., Kavanagh T. A. y Bevan M. W.** (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-7.

**Jiang C., Gao X., Liao L., Harberd N. P. y Fu X.** (2007) Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **4**, 1460-70.

**Johnson C. M., Stout P. R., Broyer T. C y Carlton A. B.** (1957) Comparative chlorine requirements of different plants species. *Plant and soil.* **8**, 337-53.

**Jones D. L.** (1998) Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant and Soil*. **205**, 25-44.

**Jones-Rhoades M. W., Bartel D. P.** (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell*. **6**, 787-99.

**Kersten B., Bürkle L., Kuhn E. J., Giavalisco P., Konthur Z., Lueking A., Walter G., Eickhoff H., y Schneider U.** (2002) Large-scale plant proteomics. *Plant Mol. Biol.* **48**, 133-41.

**Koini M. A., Alvey L., Allen T., Tilley C. A., Harberd N. P., Whitelam G. C. Y Franklin K. A.** (2009) High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr. Biol.* **5**, 408-13.

**Koncz C. y Schell J.** (1986) The promoter of gene 5 controls the tissue specific expression of chimaeric genes carried by a novel type *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-96.

**Lamarche M. G., Wanner B. L., Crépin S. y Harel J.** (2008) The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev.* **3**, 461-73.

**Lambers H., Shane M. W., Cramer M. D., Pearse S. J. y Veneklaas E. J.** (2006) Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: Matching morphological and physiological traits. *Ann. Bot.* **4**, 693-713.

**Leivar P., Monte E., Al-Sady B., Carle C., Storer A., Alonso J. M., Ecker J. R. y Quail P. H.** (2008). The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with *PIF3* and *PIF4*, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell*. **2**, 337-52.

**Lenburg M. E. y O'Shea E. K.** (1996) Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem Sci.* **21**, 383-87.

**Li D., Zhu H., Liu K., Liu X., Leggewie G., Udvardi M. y Wang D.** (2002) Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *J Biol Chem.* **277**, 27772-81

**Li X., Duan X., Jiang H., Sun Y., Tang Y., Yuan Z., Guo J., Liang W., Chen L., Yin J., Ma H., Wang J. y Zhang D.** (2006) Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **4**, 1167-84.

**Lin S. I., Chiang S. F., Lin W. Y., Chen J. W., Tseng C. Y., Wu P. C. y Chiou T. J.** (2008) Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol.* **2**, 732-46.

**López-Bucio J., Hernandez-Abreu E., Sanchez-Calderon L., Nieto-Jacobo M. F., Simpson J. y Herrera-Estrella L.** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* **129**, 244-56.

**López-Bucio J, Cruz-Ramírez A y Herrera-Estrella L.** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 280-7.

**López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Pérez-Torres A., Rampey R. A., Bartel B. y Herrera-Estrella L.** (2005) An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiol.* **2**, 681-91.

**Lorenzo O., Chico J. M., Sánchez-Serrano J. J. y Solano R.** (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **7**, 1938-50.

**Ma Z., Bielenberg D. G., Brown K. M y Lynch J. P.** (2001) Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment.* **24**, 459-67.

**Ma Z., Baskin T. I., Brown K. M. y Lynch J. P.** (2003) Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. *Plant Physiol.* **131**, 1381-90.

**Marschner H.** (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2 Ed. Boston, M. A. USA: Academic Press.

**Martín A. C., del Pozo J. C., Iglesias J., Rubio V., Solano R., de La Peña A., Leyva A. y Paz-Ares J.** (2000) Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* **24**, 559-67.

**Massari M. E. y Murre C.** (2000) Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 429-40.

**Miao Y., Laun T., Zimmermann P. y Zentgraf U.** (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **55**, 853-67.

**Mimura, T.** (1995). Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1-7.

**Misson J., Raghothama K. G., Jain A., Jouhet J., Block M. A., Bligny R., Ortet P., Creff A., Somerville S., Rolland N., Doumas P., Nacry P., Herrera-Estrella L., Nussaume L. y Thibaud M. C.** (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **33**, 11934-39.

**Miura K., Rus A., Sharkhuu A., Yukoi S., Karthikeyan A. S., Raghothama K. G., Baek D., Koo Y. D., Jin J. B., Bressan R. A., Yun D., y Hasegawa P. M.** (2005) The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 7760-65.

**Miura K., Jin J. B., Lee J., Yoo C. Y., Stirm V., Miura T., Ashworth E. N., Bressan R. A., Yun D. J. y Hasegawa P. M.** (2007). *SIZ1*-mediated sumoylation of *ICE1* controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **4**, 1403-14.

**Morcuende R., Bari R., Gibon Y., Zheng W., Pant B. D., Bläsing O., Usadel B., Czechowski T., Udvardi M. K., Stitt M. y Scheible W. R.** (2007) Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant Cell Environ.* **1**, 85-112.

**Mouillon J. M. y Persson B. L.** (2006) New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2**, 171-6.

**Muchhal U. S., Pardo J. M. y Raghothama K. G.** (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **17**, 10519-23.

**Müller R., Morant M., Jarmer H., Nilsson L. y Nielsen T. H.** (2007) Genome-wide analysis of the *Arabidopsis* leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiol.* **1**, 156-71.

**Murashige T. y Skoog F.** (1962) A revised médium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. *Physiol Plant.* **15**, 473-97.

**Nakaya M., Tsukaya H., Murakami N. y Kato Masahiro** (2002) Brassinoesteroid control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell Physiol.* **43**, 239-244.

**Nakagawa T., Kurose T., Hino T., Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka K., Jinbo T. y Kimura T.** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 31-41.

**Nakanishi H., Okumura N., Umehara Y., Nishizawa N. K., Chino M. y Mori S.** (1993) Expression of a gene specific for iron deficiency (Ids3) in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Cell Physiol.* **3**, 401-10.

**Norton J.D.** (2000) ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci.* **113**, 3897-905.

**Ogawa N., DeRisi J. y Brown P. O.** (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 4309-21.

**Ogo Y., Itai R. N., Nakanishi H., Inoue H., Kobayashi T., Suzuki M., Takahashi M., Mori S. y Nishizawa N. K.** (2006) Isolation and characterization of IRO2, a novel iron-regulated bHLH transcription factor in graminaceous plants. *J. Exp. Bot.* **11**, 2867-78.

**Ogo Y., Itai R.N., Nakanishi H., Kobayashi T., Takahashi M., Mori S. y Nishizawa N. K.** (2007) The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. *Plant J.* **3**, 366-77.

**Oliveros J.C.** (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

**Ori N., Juarez M. T., Jackson D., Yamaguchi J., Banowitz G. M. y Hake S.** (1999) Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene knotted1 under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell.* **6**, 1073-80.

**Pant B. D., Buhtz A., Kehr J., Scheible W. R.** (2008) MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J.* **5**, 731-38.

**Pant B. D., Musialak-Lange M., Nuc P., May .P, Buhtz A., Kehr J., Walther D. y Scheible W.R.** (2009) Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol.* **3**, 1541-55.

**Penfield S., Josse E. M., Kannangara R., Gilday A. D., Halliday K. J. y Graham I. A.** (2005) Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr Biol.* **22**, 1998-2006.

**Peng M., Hannam C., Gu H., Bi Y. M., Rothstein S. J.** (2007) A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the adaptability of *Arabidopsis* to nitrogen limitation. *Plant J.* **2**, 320-37.

**Pérez-Torres C. A., López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Ibarra-Laclette E., Dharmasiri S., Estelle M. y Herrera-Estrella L.** (2008) Phosphate availability alters root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell.* **20**, 3258-72.

**Poirier Y., Thoma S., Somerville C. y Schiefelbein J.** (1991) Mutant of *Arabidopsis* Deficient in Xylem Loading of Phosphate. *Plant Physiol.* **3**, 1087-93.

**del Pozo J. C., Allona I., Rubio V., Leyva A., de la Peña A., Aragoncillo C. y Paz-Ares J.** (1999) A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *The Plant Journal.* **19**, 579-89.

**Raghothama K. G.** (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **50**, 665-93.

**Rajani S. y Sundaresan V.** (2001) The *Arabidopsis* myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr Biol.* **24**, 1914-22.

**Ramirez-Parra E., Desvoyes B. y Gutiérrez C.** (2005) Balance between cell division and differentiation during plant development. *Int. J. Dev. Biol.* **5**, 467-77.

**Rausch C. y Bucher M.** (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta.* **12**, 216, 23-37.

**Raven J.A. y Smith F.A.** (1976) Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytologist.* **76**, 415-31.

**Reid C. E., Mimura T., Ohsumi Y., Walker N. A. y Smith F. A.** (2000) Phosphate transport in *Chara*: membrane transport via Na/Pi cotransport. *Plant, Cell and Environment.* **23**, 223-28.

**Richards D. E., King K. E., Ait-ali T. y Harberd N. P.** (2001) How gibberellins regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberelin signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 67-88.

**Romero I., Fuertes A., Benito M. J., Malpica J. M., Leyva A. y Paz-Ares J.** (1998) More than 80 R2-R3 MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**, 273-84.

**Rouached H., Arpat A. B. y Poirier Y.** (2010) Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. *Mol. Plant.* **3**, 288-99.

**Rubio V., Linhares F., Solano R., Martin A. C., Iglesias J., Leyva A. y Paz-Ares J.** (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* **15**, 2122-33.

**Rubio V., Bustos R., Irigoyen M. L., Cardona-López X., Rojas-Triana M y Paz-Ares J.** (2008) Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Mol. Biol.* **69**, 361-73.

**Ryan P. R., Delhaize E. y Jones D. L.** (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 527-650.

**Riechmann J.L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O. J., Samaha R. R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang J. Z., Ghandehari D., Sherman B.K. y Yu G.** (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science.* 5499, 2105-10.

**Rychter A. M., Chauveau M, Bomsel J. L. y Lance C.** (1992) The effect of phosphate deficiency on mitochondria activity and adenylate levels in bean roots. *Physiol. Plant.* **84**, 80-86.

**Sakano K.** (2001) Metabolic regulation of pH in plant cells: role of cytoplasmic pH in defense reaction and secondary metabolism. *Int Rev Cytol.* **206**, 1-44.

**Salama A y Waering P. F.** (1979) Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Experimental Botany.* **30**, 971-81.

**Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T.** (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

**Schachtman D. P., Reid R. J. y Ayling S. M.** (1998) Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiol.* **116**, 447-53.

**Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A. y Sakurai T.** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* **31**, 279-92.



- Shin H., Shin H. S., Chen R. y Harrison M. J.** (2006) Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *Plant J.* **5**, 712-26.
- Smale J. Y Viestra R. D.** (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 555-90.
- Smith F. W., Rae A. L. y Hawkesford M. J.** (2000) Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants. *Biochim Biophys Acta.* **1465**, 236-45.
- Smyth, G. K. y Speed, T. P.** (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods.* **31**, 265-273.
- Solano R., Nieto C., Diaz I. y Paz-Ares J.** (1995) Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *EMBO journal.* **14**, 1773-84.
- Stargell L.A. y Struhl K.** (1996) Mechanisms of transcriptional activation in vivo: two steps forward. *Trends Genet.* **8**, 311-5.
- Stracke R., Werber M. y Weisshaar B.** (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 447-56.
- Steber C. M. y McCourt P.** (2001). A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **125**, 763-69.
- Taiz L. y Zeiger E.** (2006) Fisiología Vegetal. Publicacions de la Universitat Jaume I. Castelló de la Plana.
- Takahashi A., Takeda K. y Ohnishi T.** (1991) Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaurea cyanus* cells in culture. *Plant Cell Physiol.* **32**, 541-47.
- Taylor C. B., Bariola P. A., delCardayre S. B., Raines R. T. y Green P. J.** (1993) RNS2: a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 5118-22.
- Theodorou M. E. y Plaxton W. C.** (1993) Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.* **2**, 339-44.
- Thomas-Chollier M., Sand O., Turatsinze J. V., Janky R., Defrance M., Vervisch E., Brohee, S. y Van Helden, J.** (2008). RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **3**, 119-27.
- Ticconi C. A. y Abel S.** (2004) Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trend Plant. Sci.* **11**, 548-55.

**Toledo-Ortiz G., Huq E. y Quail P. H.** (2003) The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell*. **15**, 1749-70.

**Trull M. C., Guiltinan M. J., Lynch J. P. y Deikman J.** (1997) The response of wild-type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus starvation. *Plant, Cell and Environ.* **20**, 85-92.

**Van Helden, J.** (2003). Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.***13**, 3593-6.

**Vance C. P., Uhde-Stone C. y Allan D. L.** (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *Plant, Cell and Environ.* **20**, 85-92.

**Versaw W. K. y Harrision M. J.** (2002) A chloroplast phosphate transporter, *PHT2;1*, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell*. **14**, 1751-66.

**Viestra R. D.** (2009) The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**, 385-97.

**Wagner B. M. y Beck E.** (1993) Cytokinins in the perennial herb *Urtica dioica* L. as influenced by its nitrogen status. *Planta*. **190**, 511-18.

**Wang H., Zhu Y., Fugioka S., Asami T., Li J. y Li J.** (2009) Regulation of *Arabidopsis* brassinosteroid signaling by atypical basic helix-loop-helix proteins. *Plant Cell*. **12**, 3781-91.

**Wang H. Y., Klatte M., Jakoby M., Bäumlein H., Weisshaar B., Bauer P.** (2007) Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. **4**, 897-908.

**Wang Y., Ribot C., Rezzonico E. y Poirier Y.** (2004) Structure and expression profile of the *Arabidopsis* PHO1 gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. *Plant Physiol.* **1**, 400-11.

**Wang Y. H., Garvin D. F. y Kochian L. V.** (2002) Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiol.* **130**, 1361-70.

**Ward J. T., Lahner B., Yakubova E., Salt D. E., Raghothama K. G.** (2008) The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiol.* **147**, 1181–1191.

**Watts F. Z.** (2004). SUMO modification of proteins other than transcription factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 211-20.

**Williamson L. C., Ribrioux S. P., Fitter A. H. y Leyser H. M.** (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 875-82.

**Woodcock D. M., Crowther P. J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S. S., Michael M. Z. y Graham M. W.** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3469-78.

**Wykoff D. D. y O'Shea E. K.** (2001) Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **159**, 1491-99.

**Yadav V., Mallappa C., Gangappa S. N., Bhatia S., Chattopadhyay S.** (2005) A basic helix-loop-helix transcription factor in *Arabidopsis*, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *Plant Cell.* **7**, 1953-66.

**Yanofsky M. F. y Nester E. W** (1986) Molecular characterization of a host-range-determining locus from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **168**, 244-50.

**Yi K., Wu Z., Zhou J., Du L., Guo L., Wu Y. y Wu P.** (2005) *OsPTF1*, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant Physiol.* **4**, 2087-96.

**Yin Y., Vafeados D., Tao Y., Yoshida S., Asami T. y Chory J.** (2005) A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell.* **2**, 249-59.

**Yu B., Xu C. y Benning C.** (2002) *Arabidopsis* disrupted in *SQD2* encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **99**, 5732-37.

